Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Zelluläre Immunreaktionen bei viralen und autoimmunen Leberkrankheiten und ihre klinische Relevanz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Friedemann Hausch
aus Gaildorf

1983

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Zelluläre Immunreaktionen bei viralen und autoimmunen Leberkrankheiten und ihre klinische Relevanz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Friedemann Hausch
aus Gaildorf

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Gerth

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die vorliegende Arbeit entstand 1979-1982 an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung II unter Vorstand von Herrn Prof.Dr.H.D.Waller.

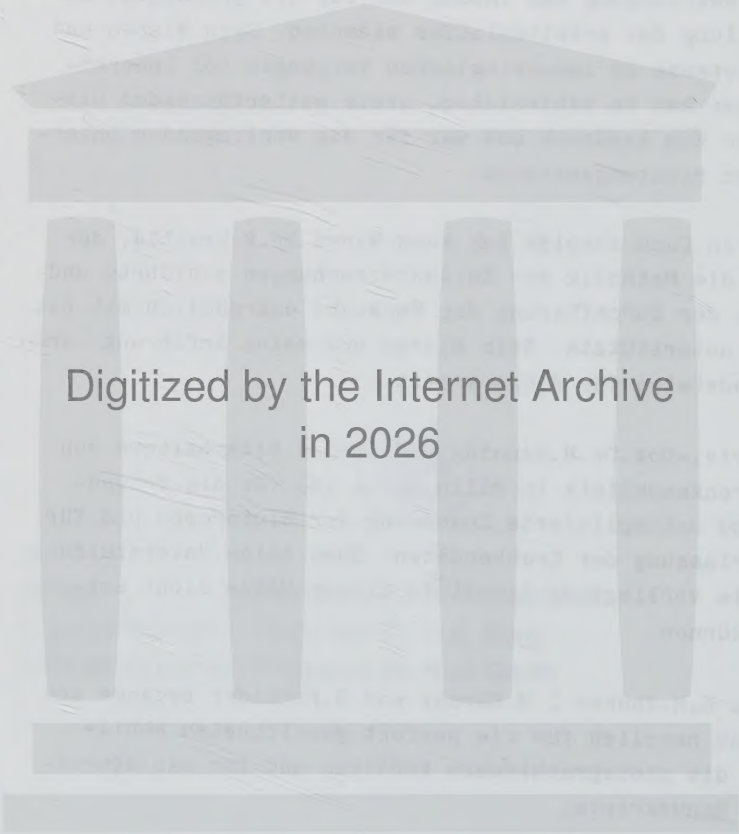
Bei Herrn Prof.Dr.P.A.Berg möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Sein Wissen und sein Interesse an immunologischen Vorgängen bei Lebererkrankungen kam in zahlreichen, stets weiterführenden Diskussionen zum Ausdruck und war für die vorliegenden Untersuchungen richtungsweisend.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Dr.N.Brattig, der mich in die Methodik der Zelluntersuchungen einführte und mich bei der Durchführung der Versuche unermüdlich mit Rat und Tat unterstützte. Sein Wissen und seine Erfahrung waren die Grundsteine für diese Arbeit.

Herrn Priv.-Doz.Dr.H.Henning und seinen Mitarbeitern von der Föhrenkampklinik in Mölln danke ich für die freundliche und unkomplizierte Zusendung der Blutproben und für die Überlassung der Krankendaten. Ohne seine Unterstützung hätte die vorliegende Arbeit in dieser Weise nicht entstehen können.

Bei Frau E.M.Jauker , M.Dürnay und R.Ranalder bedanke ich mich ganz herzlich für die perfekt gezeichneten Abbildungen, die photographischen Arbeiten und für das Schreiben des Manuskripts.

Meinen Eltern danke ich nicht nur für die finanzielle Unterstützung.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Einleitung	1
B Patienten, Material und Methoden	8
1. Patienten	8
1.1. akute Hepatitis	8
1.2. chronische Hepatitis	8
1.2.1. HB_s-Ag positive chronisch aktive Hepatitis	8
1.2.2. chronisch aktive NANB-Hepatitis, posttransfusionell	9
1.2.3. chronisch aktive NANB-Hepatitis, sporadisch	9
1.2.4. autoimmune "lupoide" chronisch aktive Hepatitis	9
2. Material	10
2.1. Puffer und Medien	10
2.2. Mitogene und Seren	10
2.3. Chemikalien und andere Reagenzien	10
2.4. Geräte und weiteres Material	11
3. Methoden	12
3.1. Lymphozytenisolierung	12
3.2. Separation von T-und B-Zell angereicherten Lymphozytenfraktionen	12
3.3. Präparation von submitochondrialem Neurospora Crassa-Antigen (NME)	13
3.4. Bestimmung der Lymphozytenstimulierbarkeit durch PHA-Mitogen und NME-Antigen	13
3.5. Bestimmung von Seruminhibitionsfaktoren	15
3.6. Bestimmung der con A-induzierten Suppressorzellaktivität	15

C Ergebnisse 17

1. Standardisierung zellulärer Immunreaktionen 17
1.1. Mitogen und Antigen induzierte Proliferation 17
1.1.1. Abhängigkeit der Lymphozytenproliferation von der Konzentration des Stimulans 17
1.1.2. Abhängigkeit der Proliferation von der Zellkonzentration 17
1.1.3. Kinetik der Lymphozytenstimulation 19
1.1.4. T-Zell-Abhängigkeit der Stimulation 20

1.2. Suppressorzellaktivität 20
1.2.1. Suppressorzellaktivität unseparierter Lymphozyten sowie in T-und B-Zell angereicherten Subpopulationen 20
1.2.2. Kinetik der Suppressorzellaktivierung 23
1.2.3. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität von der Zellkonzentration bei der Voraktivierung 23
1.2.4. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität von der Zellkonzentration in der Indikatorkultur 23
1.2.5. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität vom Verhältnis Effektorzellen zu Responderzellen 23
1.2.6. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität vom Spender der Responderzellen 26

2. Normalkollektiv 27
2.1. Lymphozytenstimulierbarkeit und Suppressorzellaktivität im Normalkollektiv 27
2.2. Altersabhängigkeit der Lymphozytenstimulierbarkeit und der Suppressorzellaktivität 27
2.3. zeitlicher Verlauf der Lymphozytenstimulierbarkeit und Suppressorzellaktivität bei Normalpersonen 30

3. akute Hepatitis 30
3.1. Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Mitogen (PHA) und Antigen (NME) bei Patienten mit akuter Hepatitis 32
3.2. Suppressorzellaktivität bei akuter Hepatitis 35

4. chronische Hepatitis 36
4.1. Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Mitogen (PHA) und Antigen (NME) bei Patienten mit chronischer Hepatitis 36
4.2. Suppressorzellaktivität bei chronischer Hepatitis 37
4.3. prognostische Relevanz der Lymphozytenfunktionen bei chronischer Hepatitis 39

5. Korrelationsstudien 40

D Diskussion 42

E Zusammenfassung 56

F Literaturverzeichnis 57

Abkürzungen

AET	2-aminoethylisothiouronium bromide
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
caH	chronisch aktive Hepatitis
con A	concanavalin A
cpm	counts per minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC , EKC	Effektorzellen , Effektorkontrollzellen
^{3}H-TdR	mit Deuterium markiertes Thymidin
HA , HAV	Hepatitis A , Hepatitis - A - Virus
HB , HBV	Hepatitis B , Hepatitis - B - Virus
HB_{s}-Ag	Oberflächen(surface)-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HB_{c}-Ak	Kern(core)-Antikörper des Hepatitis-B-Virus
LE	Lupus erythematodes
L-MM	Alpha-MM , Alpha-Methylmannosid
NANB	non A - non B
NME	Neurospora mitochondrial extract
PBC	primär-biliäre Zirrhose
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PHA	Phythaemagglutinin
RC	Responder cells
RIA	Radioimmunoassay
SGPT	Serum Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SIF	Seruminhibitionsfaktor

A Einleitung

Das Krankheitsbild der Gelbsucht wurde schon im fünften vorchristlichen Jahrhundert im babylonischen Talmud erwähnt. Dieser Krankheit wurde zwar während großer Epidemien immer mehr Beachtung geschenkt, doch erst Vogts Selbstversuche und die klassischen Studien von Krugmann und Ward (108, 109,200) konnten zeigen, daß eine Hepatitiserkrankung durch verschiedene Viren verursacht wird.

Nachdem Blumberg 1965 ein Antigen-Antikörpersystem entdeckt hatte (19), das mit Serumhepatitis assoziiert war, gelang 1970 der elektronenmikroskopische Nachweis von 42 nm-Partikeln als Erreger (40). In den folgenden Jahren wurden sensible Testmethoden (RIA) entwickelt, die den serologischen Nachweis einer Hepatitis-B-Infektion ermöglichen.

Als Erreger der A-Hepatitis wurden 27 nm-Partikel im Stuhl von Patienten mit infektiöser Hepatitis 1973 von Feinstone identifiziert (62). Heute kann auch eine Infektion durch Virus-Typ A radioimmunologisch nachgewiesen werden.

Neben der Hepatitis A und B wurde eine weitere Form der Hepatitis beobachtet, die als non A - non B (NANB) - Hepatitis bezeichnet wird und die bisher nur durch den Ausschluß von Hepatitis A und B diagnostiziert wird. In den meisten Fällen wird eine akute NANB-Hepatitis nach Bluttransfusionen beobachtet (6,7,104,136), kann aber auch sporadisch, ohne Kontakt mit infektiösen Material auftreten (44,59). Seit der Entdeckung eines Antigen-Antikörpersystems, das mit NANB-Hepatitis assoziiert ist (92,169,182, 195), sowie seit dem Nachweis elektronenmikroskopischer Veränderungen in Serum und Leber von NANB-Patienten, scheint die virale Genese der NANB-Hepatitis in vielen Fällen gesichert zu sein (23,80,134,168,192,211).

Die akute Hepatitis heilt in der Regel innerhalb von drei bis sechs Wochen ohne Folgen aus und hinterläßt eine lebenslange Immunität gegen den Erreger, die durch den serologischen Nachweis hoher Antikörpertiter gegen das Virus (anti-HB_s , anti-HB_c) angezeigt wird. Allerdings werden mit wechselnder Häufigkeit Übergänge der akuten B- und NANB-Hepatitis in ein chronisches Stadium beobachtet (50,91,102,105,127,141,153).

Bei einer Gruppe von Patienten mit HB_s-Ag negativer chronisch aggressiver Hepatitis werden Autoantikörper gegen Kerne und glatte Muskulatur, Hypergammaglobulinämien und Hauterscheinungen beobachtet und werden als autoimmune, "lupoide" chronische Hepatitis bezeichnet (14,51,110,120, 121,166). Der chronische Verlauf einer A-Hepatitis ist dagegen bisher noch nicht beschrieben worden (45,137). Das histologische Bild von Leberpunktaten während der akuten Phase erlaubt keine Vorhersagen über den Verlauf und die Prognose der Erkrankung. Die Vermutungen von Boyer et al. Anfang der siebziger Jahre, daß das Auftreten von "bridging" der Periportalfelder einen klinisch schweren Verlauf der akuten Hepatitis und deren Übergang in eine chronische Verlaufsform anzeigen (22), konnten durch eine große prospektive Studie durch Ware et al. zwischen 1973 und 1978 nicht bestätigt werden (201).

Die chronische B-Hepatitis ist in den meisten Fällen charakterisiert durch die Persistenz von HB-Partikeln in Blut und Leber der Patienten (141,152,209). Die unzureichende Elimination der Viren kann jedoch nicht allein verantwortlich sein für die Fortdauer des entzündlichen Geschehens. Denn auf der anderen Seite wurden bei gesunden Personen über Jahre hinweg HB_s-Partikel nachgewiesen, ohne daß es zu nennenswerten histologischen Veränderungen der Leber oder zu laborchemischen Anzeichen des Zelluntergangs kam (61, 93,103,149,208). Der Persistenz von Virus-Partikeln in Serum und Hepatozyten kommt im Falle einer Hepatitis-B-Infektion nicht unbedingt Krankheitswert zu (76,147).

Heute geht man davon aus, daß erst die Immunreaktion des Körpers zum Zelluntergang in der Leber führt (31,46,48, 188). In Anbetracht dessen können Störungen der lymphozytären Funktionen, neben Menge und Art des infektiösen Agens, Ursache sein für die fortdauernde Infiltration des Leberparenchyms durch mononukleäre Zellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis (31,49,54,87,101,103,113).

Immunologische Vorgänge sind in den letzten zwanzig Jahren zum Verständnis von Krankheiten immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Nachdem die zentrale Rolle der Lymphozyten bei der Regulation des Immungeschehens erkannt worden war, und seit einigen Jahren eine Methode zur Verfügung steht, Lymphozyten in ausreichender Menge und Reinheit aus Blutproben zu isolieren (20), gibt es eine große Zahl von Untersuchungen über die Funktion von lymphoiden Zellen (8,13,74,81).

Es konnte gezeigt werden, daß Mitogene viele Klone immunkompetenter Lymphozyten zur Proliferation anregen, wobei die Stimulierbarkeit individuell und zeitabhängig stark variiert (57,125,145,158). Eine deutliche Erniedrigung der Mitogenstimulierbarkeit konnte bei Patienten mit Karzinomen (180) , M.Hodgkin (184) , Lupus erythematodes (86,123) und rheumatoider Arthritis (86) beobachtet werden. Durch Mitogene werden hauptsächlich T-Zellen zur Proliferation angeregt, wobei eine reduzierte Stimulierbarkeit nicht auf eine geringere Anzahl von T-Zellen im Patientenblut, sondern auf eine veränderte funktionelle Eigenschaft der Lymphozyten zurückzuführen ist (12,78, 95,158).

Die Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch spezifische Antigene dagegen muß durch Sensibilisierung erworben werden (9,84,179). Lymphozyten von Normalpersonen können im allgemeinen gut auf Antigene reagieren, die ubiquitär vorkommen wie Candida albicans, Escherichia coli und Staphylococcus aureus (150,184).

Man kann davon ausgehen, daß jeder Mensch Kontakt mit diesen Mikroorganismen hatte und eine spezifische Reaktivität entwickelt hat.

Ebenso zeigen Personen mit Antikörpertitern gegen Herpes simplex, Rubella (89) und Mumps-Viren (124) eine spezifische Stimulierbarkeit durch diese Antigene, während Personen, die nicht exponiert waren, nicht reagieren.

Bei Patienten mit der parasitären Erkrankung Schistosomiasis war eine spezifische Reaktivität nur bei akuter Infektion, jedoch nicht im chronischen Stadium nachweisbar (56,146). Das Fehlen spezifischer Reaktivität trotz andauernder Anwesenheit von Antigen wurde mit der Entstehung spezifischer Suppressorzellen erklärt und könnte in diesem Fall die Ursache sein für die Entstehung des chronischen Geschehens.

Die Regulation des Immunsystems beruht auf einem komplexen Gleichgewicht zwischen Helfer- und Suppressorzellen (13, 28,157) sowie deren sekretorischen Produkten (65,133, 162). Das Zusammenspiel der einzelnen Zellfunktionen ist noch weitgehend unbekannt (65,66,133).

In den letzten Jahren wurden Zellpopulationen charakterisiert, die die Zellproliferation, (83,170) die Antikörperproduktion (75,164) und die Zytotoxizität (58,88) beeinflussen können.

Diese Suppressorzellen wiederum können polyklonal durch Mitogene oder spezifisch durch Antigene aktiviert werden (21,30,176). Bei Patienten mit Hypogammaglobulinämien (171,197) , LE (25,160) , rheumatoider Arthritis (47) , PBC (212) und Myelomen (26) ist eine erniedrigte con A-induzierte Suppressorzellaktivität beschrieben worden.

Es ist noch unklar, ob eine erniedrigte Suppressorzellaktivität die Folge des Krankheitsgeschehens ist oder eine ursächliche Rolle in der Pathogenese spielt (13, 36,66).

Im Tiermodell lassen sich spontan auftretende Autoimmunerscheinungen bei der NZB W/B-Maus durch eine deutlich reduzierte Aktivität der Suppressorzellen erklären, die bei diesen Tieren regelmäßig gefunden wird (29,106). Bei diesen Mäusehybriden scheint der Mangel an Suppression zu einer Proliferation und Aktivität von Zellklonen zu führen, die Antikörper gegen körpereigene Strukturen bilden (106, 183). Bei Patienten mit LE wurde in den meisten Untersuchungen eine deutlich reduzierte Suppressorzellaktivität beschrieben (1,25,135). Wie bei den Mäusen mit spontanen Autoimmunphänomenen wird auch hier angenommen, daß infolge mangelnder suppressiver Einflüsse eine überschießende Antikörperproduktion gegenüber Fremd- und Autoantigenen möglich ist (178,186). Sogar therapeutische Konsequenzen erscheinen möglich (135).

Eine Überfunktion der Suppressorzellen spielt möglicherweise eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von Hypogammaglobulinämien; die B-Lymphozyten dieser Patienten sind jedenfalls in der Lage, Immunglobuline zu produzieren, wenn der immunsuppressive Einfluß in vitro ausgeschaltet wird (172,198).

Die Untersuchungen lymphozytärer Funktionen bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis ergaben ein uneinheitliches Bild: Während Feighery et al. (60) , Thestrup et al. (187) und Newble et al. (140) eine erniedrigte PHA-Stimulierbarkeit beobachtet haben, die sich mit klinischer Erholung normalisierte, fanden Wands et al. (199) bei den von ihnen untersuchten Patienten eine normale Reaktion auf PHA; Sodoman et al. (175) beschrieben eine Hyperreaktivität gegenüber PHA. Die Autoren untersuchten allerdings die Lymphozytenstimulierbarkeit bei unterschiedlichen Zell- und Mitogenkonzentrationen oder im Vollblut, so daß ein direkter Vergleich schwierig ist. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis wurde durchweg eine beträchtliche Streuung der PHA-Stimulierbarkeit beobachtet (60, 140,187,199).

Stimulationsversuche mit einem ubiquitären Antigen, durch das die Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten möglicherweise sensibler erfaßt werden kann als bei Stimulationen mit polyklonalen Mitogenen, wurden an Patienten mit Hepatitis noch nicht durchgeführt.

Die Stimulation von Lymphozyten mit dem spezifischen HB_s-Antigen wurde bei akuter Hepatitis 1973 von DeGast (42) und 1975 von Tong (189) durchgeführt. Übereinstimmend berichten sie über eine gesteigerte Proliferation menschlicher Lymphozyten nach Stimulation mit gereinigtem HB_s-Antigen während der Genesungsphase akuter Hepatitis-B-Infektionen. Lymphozyten von Normalpersonen, von asymptomatischen Carriern und von Patienten mit chronischer Hepatitis ließen sich nicht stimulieren.

Die Suppressorzellaktivität bei akuter Hepatitis zeigt unterschiedliche Ergebnisse: Chisari et al. (32) fanden unter Verwendung autologer Responderzellen eine reduzierte Suppressorzellaktivität im akuten Stadium der Infektion, die sich mit klinischer Besserung normalisierte, während Hodgson et al. in der akuten Phase eine normale Suppressorzellfunktion beobachtete (85). Bei ihm zeigten lediglich die drei Patienten, die vor dem Höhepunkt der Transaminasenaktivität untersucht wurden, erniedrigte Werte. Kashio et al. (97) und Kakumu et al. (94), die Patienten mit akuter Hepatitis während der Genesungsphase untersuchten, berichteten von normaler oder sogar erhöhter Suppressorzellaktivität.

Bei chronischer Hepatitis fanden verschiedene Autoren uneinheitliche Suppressorzellaktivitäten (32,85,94,97,190). Ungefähr die Hälfte der Patienten zeigte eine reduzierte Suppressorzellfunktion, wobei eine Korrelation zu klinischen, histologischen oder laborchemischen Parametern nicht festgestellt werden konnte. Coovadia et al. (37) wie auch Tremolada et al. (190) beschrieben bei Patienten mit autoimmuner chronischer Hepatitis eine deutlich reduzierte Suppressorzellfunktion.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis gleichzeitig die Proliferation nach PHA-Aktivierung, die Stimulierbarkeit durch ein Antigen und die Suppressorzellaktivität bestimmt, um auch mögliche Abhängigkeiten dieser Zellfunktionen feststellen zu können.

Damit die Ergebnisse mit den Untersuchungen anderer Autoren verglichen werden konnten, war es notwendig, durch methodische Versuche optimale Standardbedingungen zu entwickeln. Den Patientengruppen wurde ein Normalkollektiv unter Berücksichtigung der individuellen zeitlichen Schwankungen gegenübergestellt. Bei Patienten mit akuter Hepatitis wurden Verlaufsuntersuchungen durchgeführt. Bei den Patienten mit chronischer Hepatitis wurde eine Unterteilung anhand der viralen bzw. autoimmunen Genese der Erkrankung getroffen. Durch die Kontrolle des klinischen Verlaufs bei Patienten mit chronischer Hepatitis sollte die prognostische Bedeutung der Lymphozytenstimulierbarkeit und der Suppressorzellaktivität überprüft werden.

B Patienten, Material und Methoden

1. Patienten

1.1 akute Hepatitis

32 Patienten mit akuter Hepatitis zeigten typische Symptome wie Abgeschlagenheit, Übelkeit und Verdauungsstörungen im Prodromalstadium gefolgt von Ikterus mit Dunkelfärbung des Urins und Entfärbung des Stuhls; laborchemisch konnte immer eine deutliche Erhöhung der Transaminasenaktivitäten gemessen werden. Serologisch dienten die Marker HB_s-Antigen, HB_c-Antikörper und HAV-Antikörper (Ig-M) zur Klassifikation in akute A-,B- und nonA-nonB (NANB)-Hepatitis. Bei 9 Patienten wurde eine verzögerte Ausheilung der Krankheit beobachtet, d. h. die Transaminasenaktivität war nach vier Krankheitswochen mit Werten über 100 IU immer noch deutlich erhöht; ein Übergang in eine chronische Verlaufsform konnte jedoch in keinem Fall beobachtet werden.

1.2 chronische Hepatitis

Die Diagnose chronische Hepatitis wurde nur dann gestellt, wenn das Leberpunktat des betreffenden Patienten das histologische Bild einer chronisch aktiven Hepatitis (caH) (43,90) zeigte. Eine ätiologische Einteilung erfolgte anhand der Marker HB_s-Antigen und HB_c-Antikörper und anhand der Anamnese.

1.2.1. HB_s-Antigen positive chronisch aktive Hepatitis

Von 17 Patienten mit HB_s-Antigen positiver caH konnte in 6 Fällen HB_e-Antigen und in allen Fällen HB_c-Antikörper nachgewiesen werden.

1.2.2. chronisch aktive NANB-Hepatitis, posttransfusionell

Die sieben Patienten dieser Krankheitsgruppe erkrankten an HB_s-AG, HB_c-Ak und HAV-Ak (Ig-M) negativer Hepatitis, 3 bis 9 Wochen nachdem sie Blutkonserven erhalten hatten und entwickelten eine chronische Verlaufsform.

1.2.3. chronisch aktive NANB-Hepatitis, sporadisch

In dieser Gruppe wurden 11 Patienten mit histologisch gesicherter caH bei gleichzeitigem Fehlen von HB-Markern zusammengefaßt. Eine Infektionsquelle (Blutkonserven, Kontakt mit infektiösem Material) war nicht zu eruieren. Der Beginn der Erkrankung ließ sich in vielen Fällen nicht eindeutig festlegen.

1.2.4. autoimmune "lupoide" chronisch aktive Hepatitis

Die Klassifizierung von Patienten mit chronischer aktiver Hepatitis in die Gruppe der autoimmunen "lupoiden" Hepatitiden erfolgte dann, wenn bei negativer Hepatitis-B-Serologie Autoantikörper gegen Kerne oder glatte Muskulatur und Hypergammaglobulinämie nicht nur vorübergehend auftraten, sondern eine ständige Begleiterscheinung des Krankheitsbildes waren. In den meisten Fällen zeigten die Patienten schubweise auftretende, LE-ähnliche Symptomatik wie Hauterscheinungen oder Gelenkbeschwerden.

2. Material

2.1. Puffer und Medien

- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) , Ca^{++}-, Mg^{++}-free, Gibco Labs. (Kat.Nr. 041-4175)
- Hank's BSS , Gibco Labs. (Kat.Nr. 041-4025)
- Kochsalzlösung (0,9 %) , Braun Melsungen AG (Reg.Nr. 45342)
- RPMI 1640 mit L-Glutamin , Gibco Labs. (Kat.Nr. 187 G)
- Saccharose medium : 0,33 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0,15 % Bovines Serum Albumin in aqua dest.

2.2. Mitogene und Seren

- Concanavalin A (con A) , Serva Feinchemica (Kat.Nr. 17475 M)
- Phythaemagglutinin (PHA) , Difco Labs. (Kat.Nr. 3110-56)
- Fetales Kälberserum (FKS) , Reheis Chemical Company
- Anti-Human-Immunoglobulin (sheep) fluoresein labelled , MF 01 , Wellcome Reagents Limited

2.3. Chemikalien und andere Reagenzien

- Acridinorange , Merck (Kat.Nr. 1333)
- Alpha-Methylmannosid (Alpha-MM) , Sigma (Kat.Nr. M-6882)
- AET , Merck-Suchardt (Kat.Nr. 820064)
- Beta-Glucuronidase , Boehringer (Kat.Nr. 127051)
- Erythtrozytensuspension ORAW 31-32 , Behring
- Gentamicin , Flow Labs. (Kat.Nr. 16-762-45)
- Glutamin , Flow Labs. (Kat.Nr. 16-801-48)
- Heparin-Na 25000 IE , Organon Teknika (Kat.Nr. 1097.00.00)
- Lymphoprep^{R} , Neygaard, Oslo

- Szinzillationsflüssigkeit (Quickszint^{R}) , Zinsser (Kat.Nr. 16808)
- (6-^{3}H)-Thymidin, spezifische Aktivität 2 Ci/mM , Amersham-Buchler (Kat.Nr. TRA 306)

2.4. Geräte und weiteres Material

- Einmalpipetten 10 ml , Falcon (Kat.Nr. 7530)
- Filter , Titertex , Flow Labs. (Kat.Nr. 78-105-05)
- Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300 , Nuklear Chicago
- Hamiltonspritze , Fischer (Kat.Nr. 81420, 1002 N)
- 12-Kanal-Mikropipette , Flow Titertek (Kat.Nr. 77-889-00)
- Mikrotiterplatten System Cooke , Greiner (Modell 655160)
- Millipore Filter 0,45 um , Millipore Corp. , Frankfurt
- Plastikröhrchen (50 ml) , Falcon (Kat.Nr. 2070)
- Polyäthylenzählflaschen , Zinsser (Kat.Nr. 714)
- Polypropylenröhrchen , Greiner (Kat.Nr. 217)
- Ultrazentrifuge , Kontron TGA-50
- Zellkultursammler , Titertek-Skatron AS , Lierbyen
- Zentrifuge Rotixa , Hettich

3. Methoden

3.1. Lymphozytenisolierung

Die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut erfolgte nach der Methode von Böyum. (20) 15 ml heparinisiertes (25 IE/ml) Venenblut, das den Spendern jeweils zwischen 8 und 9 Uhr abgenommen wurde, wurde mit 10 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und 15 ml einer Ficoll-Hypaque-Lösung der Dichte 1,077 g/ml überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 800 g wurden die Lymphozyten aus der Interphasenschicht abpipettiert und dreimal in Ca^{++}-,Mg^{++}-freier Hank's Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden die Zellen in Medium (RPMI 1640,ergänzt mit $2x10^{-3}$M L-Glutamin und 100 µg/ml Gentamicin) resuspendiert. Die Zellen mußten wenigstens zweimal mit übereinstimmenden Ergebnissen gezählt werden (Vitalfärbung mit Acridinorange), bevor die endgültige Zellkonzentration eingestellt wurde.

3.2. Separation von T- und B-Zell angereicherten Lymphozytenfraktionen

T- und B-Zell angereicherte Lymphozytensubpopulationen wurden durch Rosettierung mit AET-behandelten Erythrozyten gemäß der Methode von Madsen (122) gewonnen. Die AET-Behandlung der Erythrozyten erfolgte, indem 3 ml einer frischen, in kalter Saline gewaschenen Erythrozytensuspension 20 Minuten lang bei $37^{o}C$ mit einer 0,14 M AET-Lösung (pH 9) inkubiert und anschließend solange in kalter, Ca^{++}-,Mg^{++}-haltiger Hank's Lösung gewaschen wurden, bis keine Lyse mehr auftrat. Beim letzten Waschgang wurden die AET-behandelten Erythrozyten in 12 ml RPMI und 8 ml absorbiertem fötalem Kalbsserum vorsichtig suspendiert und mit 20 ml einer $5x10^{6}$ Zellen/ml-enthaltenden Lymphozytensuspension gemischt. Zur Rosettenbildung wurde die Zellsuspension 15 Minuten lang bei $37^{o}C$ inkubiert, bei $4^{o}C$ und 50 g sedimentiert und eine Stunde lang bei $4^{o}C$ inkubiert.

Das Sediment wurde durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die Lösung mit rosettierten und nicht rosettierten Lymphozyten wurde im Verhältnis 2:3 einer 4°C-kalten Ficoll-Hypaque-Lösung überschichtet und 15 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert. B-Zellen angereicherte Lymphozytenpopulationen wurden nur direkt aus der Interphasenschicht abpipettiert. Die T-Zellen angereicherte Fraktion wurde durch Lyse der Erythrozyten mit 0,84 %-NH_4-Cl-Lösung bzw. mit autologen Serumsverdünnungen in absteigender Konzentration aus dem Pellet gewonnen. Die B-Zellen angereicherte Fraktion enthielt 85-90 % Zellen, die sich mit markiertem Anti-Human-Globulin anfärben ließen. Die Reinheit der T-Zell angereicherten Fraktion wurde durch erneute Rosettenbildung bei einem Verhältnis Erythrozyten zu Lymphozyten 25:1 ermittelt und betrug 90-95 %.

3.3. Präparation von submitochondrialem Neurospora Crassa-Antigen (NME)

Konidien des Bäckerschimmels (Neurospora crassa) konnten 16 Stunden lang in Saccharosemedium wachsen. Protoblasten wurden nach enzymatischem Abbau präpariert. (Beta-Glucuronidase) Die Protoblasten wurden lysiert und durch Zentrifugation die Mitochondrien gewonnen. Nach Ultraschallbehandlung konnten durch Ultrazentrifugation (100000 g , 30 Minuten) submitochondriale Partikel erhalten werden. Für Stimulationsversuche wurden die submitochondrialen Antigene durch Filtration (0,45 µm) sterilisiert.

3.4. Bestimmung der Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch PHA-Mitogen und Neurospora-Antigen (NME)

Lymphozyten lassen sich in Zellkulturen durch Mitogene und Antigene zur Proliferation anregen, wobei das Ausmaß der Proliferation anhand der DNS-Synthese gemessen werden kann. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle verwendeten Testplatten mit 150 µl kompletter Kulturlösung

vorpipettiert (66 % RPMI, 25 % gepooltes Serum, Mitogen/ Antigen) und bei -20°C aufbewahrt, so daß am Testtag nur noch 50 µl der sorgfältig eingestellten Zellsuspension zugefügt werden mußten.

Die Stimulationsversuche wurden jeweils in dreifachen Ansätzen sowohl mit PHA als Mitogen wie auch mit einem submitochondrialen Extrakt von Neurospora Crassa (NME) als Antigen durchgeführt. Menge und Konzentrationen der Reagenzien bei Standardbedingungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Acht bzw. zwölf Stunden vor Ablauf der Inkubation in einer H_2O-gesättigten 5 %-CO_2-Atmosphäre wurde den Zellen 20 µl radioaktiv (2 Ci/mM) markiertes Thymidin (^{3}H-TdR) zugesetzt, das in Abhängigkeit von der Proliferationsrate in die lymphozytäre DNS eingebaut wird. Die Kulturen wurden beendet, indem die Zellen mit einem Scatron Zell-Harvester auf Glasfiberfilter abgesaugt, gewaschen und die Filter in Polyäthylenröhrchen getrocknet wurden. Die Radioaktivität des in die Zellen eingebauten Thymidins wurde in einem ml Szintillationsflüssigkeit in einem Beta-Counter gemessen. Die Impulse pro Minute (cpm) der Parallelansätze wurden gemittelt und als Äquivalent für die DNS-Synthese der transformierten Zellen gewertet.

		PHA	NME
Serum-Pool		20 %	20 %
Stimulans	Menge pro Ansatz	0,8 µg	4 µg
	Endkonz.pro Ansatz	4 µg/ml	20 µg/ml
Zellen	pipettierte Konz.	$1{,}5\times10^6$ PBMC/ml	3×10^6 PBMC/ml
	Zellzahl pro Ansatz	$0{,}75\times10^5$ PBMC	$1{,}5\times10^5$ PBMC
	Konz. in Kulturlösung	$0{,}375\times10^6$ PBMC/ml	$0{,}75\times10^6$ PBMC/ml
Inkubationszeiten	gesamt	42 h	142 h
	mit H-TdR	8 h	12 h

Tab. 1 : Standardbedingungen für die Bestimmung der Mitogen (PHA)- und Antigen (NME)-Stimulierbarkeit

3.5. Bestimmung von Seruminhibititionsfaktoren (SIF)

Lymphozyten ($0{,}375 \times 10^6$ PBMC/ml) von wenigstens drei Normalpersonen wurden unter Zusatz des zu untersuchenden Serums (20 %) mit 4 und 10 µg/ml PHA 42 Stunden lang im Brutschrank aktiviert und die Proliferationsrate in Gegenwart des Testserums und des Kontrollserums gesunder Spender nach folgender Formel berechnet:

$$\text{SIF-Aktivität} = \frac{\text{cpm nach Lymphozytenstimulation in Gegenwart von Patientenserum}}{\text{cpm nach Lymphozytenstimulation in Gegenwart von Normalserum}} \times 100\ \%$$

3.6. Bestimmung der con A-induzierten Suppressorzellaktivität

Lymphozyten (2×10^6PBMC/ml) wurden in Anwesenheit von 20 % gepooltem Serum mit 20 oder 60 µg/ml con A voraktiviert (Effektorzellen,EC), in Parallelansätzen wurden die Lymphozyten unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne con A vorinkubiert (Effektorkontrollzellen, EKC). Nach 45 Stunden wurden die Zellen dreimal mit 1 %-iger Alpha-Methylmannosid-Lösung (Alpha-MM) gewaschen, mit 20 Gy bestrahlt, um eine weitere DNS-Synthese zu verhindern und nach sorgfältigem Zählen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Effektorzellsuspension, 50 µl einer frisch isolierten, unbehandelten Zellsuspension (Responderzellen, RC, 2×10^6Zellen/ml, bei Verlaufsuntersuchungen immer vom selben Spender), 50 µl RPMI mit einem Gehalt von 20 ug/ml con A und 50 µl gepooltes 80 %-iges Normalserum wurden dreifach in Mikrotiterplatten pipettiert und 70 Stunden lang im Brutschrank inkubiert. Während der letzten 10 Stunden wurden die Zellen mit radioaktivem Thymidin markiert, nach Ablauf der Inkubationszeit geerntet und das eingebaute ^{3}H-TdR im Counter gemessen. Die Suppression wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Suppression} = \frac{^{3}\text{H-TdR-Einbau in cpm der RC, die zusammen mit EC kultiviert wurden}}{^{3}\text{H-TdR-Einbau in cpm der RC, die zusammen mit EKC kultiviert wurden}} \times 100\%$$

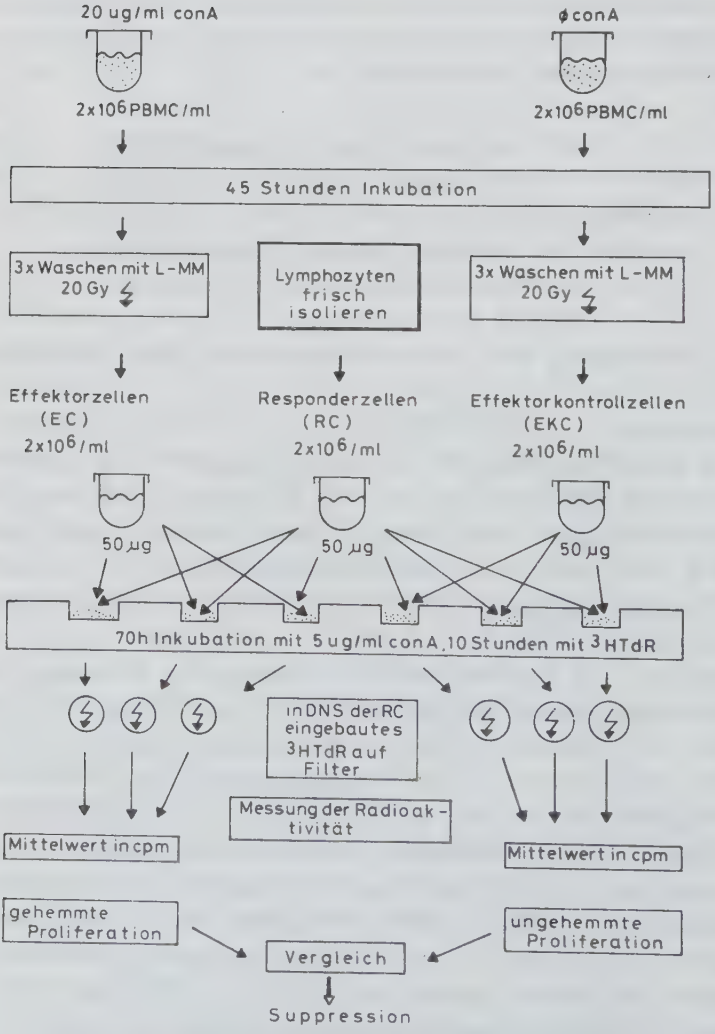


Abb. 1 : Schematische Darstellung der Bestimmung der Suppressorzellaktivität unter Standardbedingungen

C Ergebnisse

1. Standardisierung zellulärer Immunreaktionen

Um einen Vergleich der vorliegenden Untersuchungen mit den Ergebnissen anderer Laboratorien zu ermöglichen, wurde der Einfluß von Inkubationszeiten, Mitogen- bzw. Antigenkonzentrationen sowie der Zellkonzentrationen auf die zellulären Immunreaktionen untersucht.

1.1. Mitogen und Antigen induzierte Proliferation

1.1.1. Abhängigkeit der Lymphozytenproliferation von der Konzentration des Stimulans

Bei 7 Personen wurde die Lymphozytenstimulierbarkeit in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 256 µg/ml PHA und von 5 bis 160 µg/ml NME bestimmt. Repräsentativ ist in Abbildung 2 der ^{3}H-TdR-Einbau nach PHA- und NME-Aktivierung von jeweils zwei Personen mit normaler und bei einem Patienten mit reduzierter Reaktivität dargestellt. Die optimale Stimulierbarkeit lag bei Lymphozyten mit normaler und reduzierter Reaktivität in demselben Konzentrationsbereich.

1.1.2. Abhängigkeit der Proliferation von der Zellkonzentration

Abbildung 3 zeigt die Abhängigkeit der Mitogen- und Antigenantwort von der Konzentration der eingesetzten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. (PBMC) Die niedrigste Konzentration, die notwendig war, um eindeutige Proliferationsraten zu erhalten, lag für PHA bei $0{,}375 \times 10^{6}$ PBMC/ml und für NME bei $0{,}75 \times 10^{6}$ PBMC/ml.

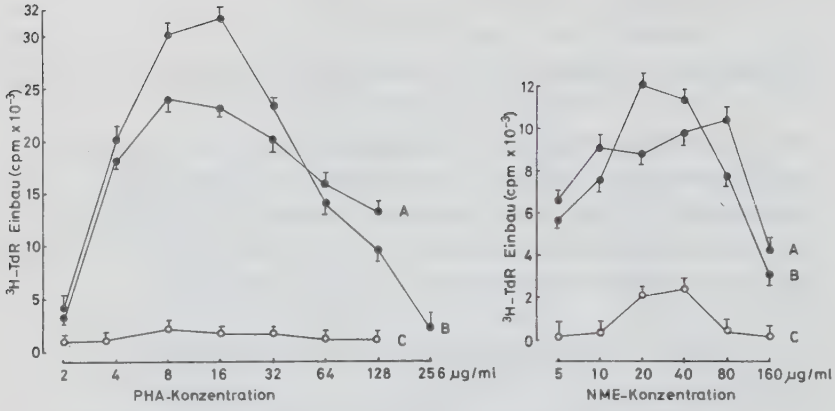


Abb. 2 : Konzentrationsabhängigkeit der optimalen Stimulierbarkeit der Lymphozyten bei zwei gesunden Spendern (A , B) und einem Patienten mit chronischer Hepatitis (C) von der Mitogenkonzentration (0,375x10^6 PBMC/ml) und der Antigenkonzentration (0,75x10^6 PBMC/ml) .

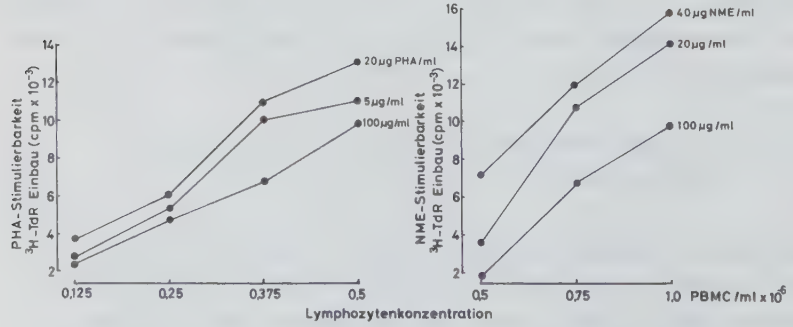


Abb. 3 : Abhängigkeit der Lymphozytenproliferation von der Zellkonzentration nach 42 Stunden Inkubation mit 5,20 und 100 µg/ml PHA und nach 142 Stunden Inkubation mit 20,40 und 100 µg/ml NME.

1.1.3. Kinetik der Lymphozytenstimulation

Die unterschiedliche Kinetik bei dem Mitogen PHA und dem Antigen NME wird in Abbildung 4 dargestellt. Während der ^{3}H-TdR-Einbau bei polyklonaler Stimulation durch PHA bereits nach 24 Stunden nachweisbar ist und zwischen 72 und 84 Stunden sein Maximum hat, fand sich eine messbare Proliferation in Gegenwart von NME erst nach 78 Stunden und war nach 162 Stunden am stärksten ausgeprägt.

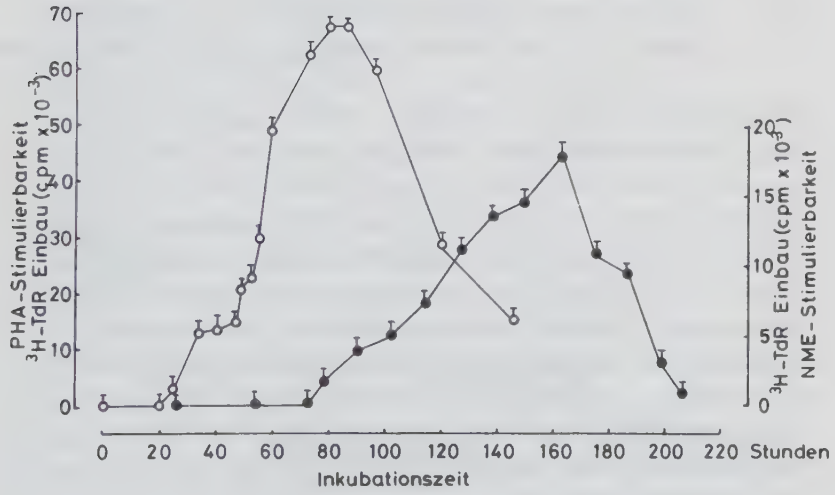


Abb. 4 : Kinetik der Lymphozytenproliferation nach polyklonaler Stimulation mit 4 µg/ml PHA (o) bei 0,375x10^{6} PBMC/ml und Antigenstimulation mit 20 µg/ml NME (●) bei 0,75x10^{6} PBMC/ml.

1.1.4. T-Zellen Abhängigkeit der Stimulation

Um zu ermitteln, welche Zellpopulationen durch NME aktiviert werden und proliferieren, wurden Lymphozyten von drei Normalpersonen und zwei Patienten mit Hilfe der Rosettentechnik in T- und B-Zell angereicherte Fraktionen separiert. Der Reinheitsgrad der verwendeten Zellpopulationen betrug 85 bis 95 %. Die Ergebnisse der Stimulationsversuche sprechen dafür, daß NME wie PHA selektiv T-Zellen zur Proliferation anregen. (Abbildung 5)

1.2. Suppressorzellaktivität

1.2.1. Suppressorzellaktivität unseparierter Lymphozyten sowie in T- und B-Zell angereicherten Subpopulationen

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) sowie T- und B-angereicherte Fraktionen von zwei gesunden Lymphozytenspendern wurden 45 Stunden lang mit und ohne con A vorkultiviert und der Einfluß dieser Effektorzellen auf die Mitogen induzierte Proliferation homologer Responderzellen (RC) in einer Indikatorkultur untersucht. T-Zell angereicherte Fraktionen supprimierten im Gegensatz zu B-Zellen wie unseparierte Lymphozyten die Responderzellstimulation. (Abbildung 6) Die Suppression homologer Responderzellen war bei 5 µg/ml con A in der RC-Kultur am stärksten ausgeprägt und nimmt bei höheren Mitogenkonzentrationen ab.

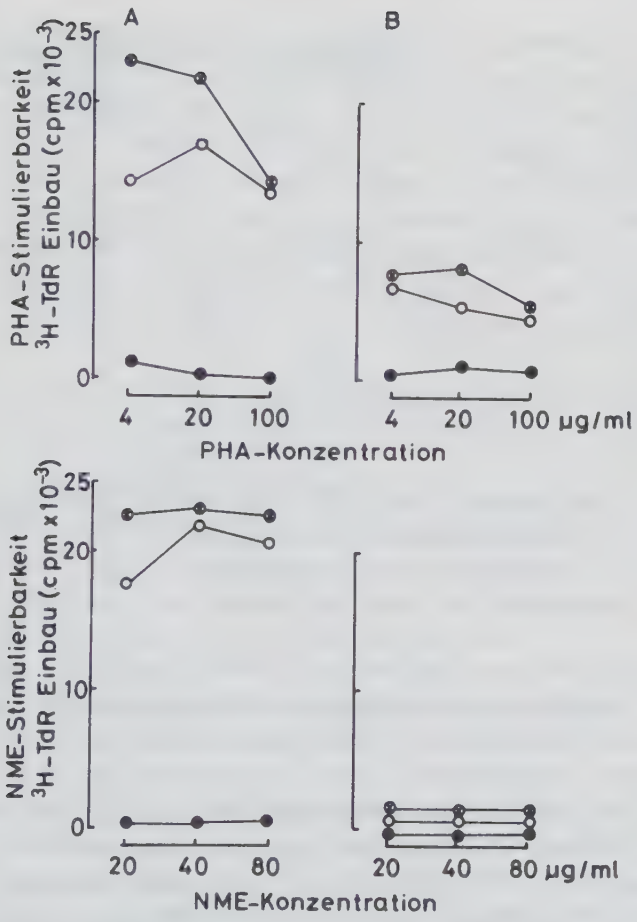


Abb. 5 : Proliferation von T- (▪) bzw. B- (●) Zellen angereicherten Lymphozytenfraktionen und unseparierten Zellen (o) nach Stimulation mit PHA und NME von einem gesunden Lymphozytenspender (A) mit normaler und einem Patienten (B) mit reduzierter Stimulierbarkeit.

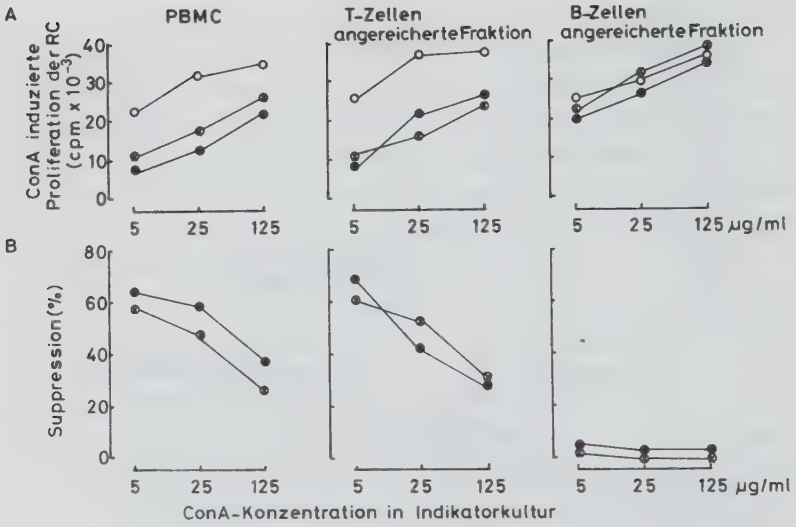


Abb. 6 : Unseparierte Lymphozyten, T-Zell und B-Zell angereicherte Subpopulationen wurden 45 Stunden lang ohne con A (o , Effektorkontrollzellen) sowie mit 20 µg/ml con A (◙) und 60 µg/ml von A (● , Effektorzellen) voraktiviert, mit Alfa-MM-haltiger HBSS gewaschen und mit 20 Gy bestrahlt. In der Indikatorkultur wurde die suppressive Wirkung der Effektorzellen im Vergleich zu den Effektorkontrollzellen auf die Mitogen induzierte Proliferation homologer Responderzellen (RC) nach 70-stündiger Inkubation bestimmt. Dargestellt ist der ^{3}H-TdR-Einbau der Responderzellen (A) nach 5,25 und 125 µg/ml con A-Stimulation sowie die entsprechende Suppression durch con A voraktivierte Zellen (B).

1.2.2. Kinetik der Suppressorzell-Aktivierung

Um zu ermitteln, wie lange Effektorzellen aktiviert werden müssen, um eine optimale Suppression der RC-Proliferation zu bewirken, wurde die Dauer der Voraktivierungsphase zwischen 24 und 96 Stunden variiert. Bereits nach 24 Stunden Voraktivierung war eine deutliche Suppression der Mitogen induzierten Proliferation homologer Responderzellen durch Effektorzellen im Vergleich zu Effektorkontrollzellen nachweisbar. Ein Abfall der suppressiven Wirkung war nach 96 Stunden Vorinkubation festzustellen. (Abbildung 7)

1.2.3. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität von der Zellkonzentration bei der Voraktivierung

Abbildung 8 zeigt eine deutliche Suppressorzellaktivität nach Voraktivierung von 1 bis $2x10^6$/ml Lymphozyten. Bei höheren Zellkonzentrationen war ein Rückgang der suppressiven Wirkung zu beobachten, wenn die Responderzellen mit 5 oder 25 µg/ml con A stimuliert wurden.

1.2.4. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität von der Zellkonzentration in der Indikatorkultur

Die Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität in der Indikatorkultur ist in Abbildung 9 dargestellt. Bei steigender Konzentration von 0,375 bis $0,675x10^6$/ml der Effektorzellen und Responderzellen bei einem Verhältnis 1:1 nimmt die Suppressorzellaktivität zu.

1.2.5. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität vom Verhältnis der Effektorzellen zu Responderzellen

Optimale Suppression wurde beobachtet, wenn in der Indikatorkultur Effektorzellen und Responderzellen im Verhältnis 1:1 vorhanden waren. Höhere wie auch niedrigere Verhältnisse von Effektorzellen zu Responderzellen führten zu einer geringeren Suppression. (Abbildung 10)

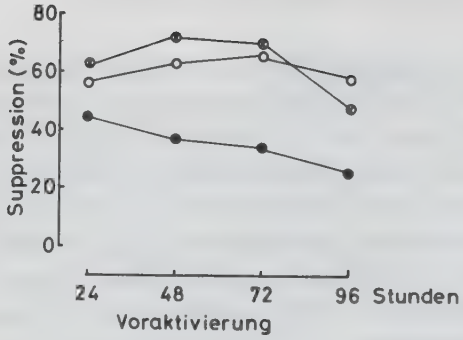


Abb. 7 : Suppression der Proliferation homologer Responderzellen nach 70-stündiger Stimulation mit 5 µg/ml con A durch Effektorzellen, die 24,48,72 oder 96 Stunden mit 20 (o) , 60 (⊠) oder 100 (●) µg/ml con A voraktiviert wurden.

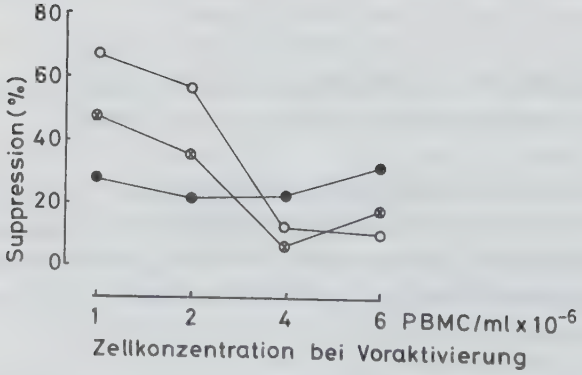


Abb. 8 : Suppression durch Effektorzellen, die 45 Stunden lang mit 20 µg/ml con A bei Zellkonzentrationen von 1,2,4 und $6x10^6$ PBMC/ml voraktiviert wurden, auf die Proliferation von $0,5x10^6$/ml Responderzellen nach 70-stündiger Inkubation mit 5 (o) , 25 (⊠) und 125 (●) µg/ml con A.

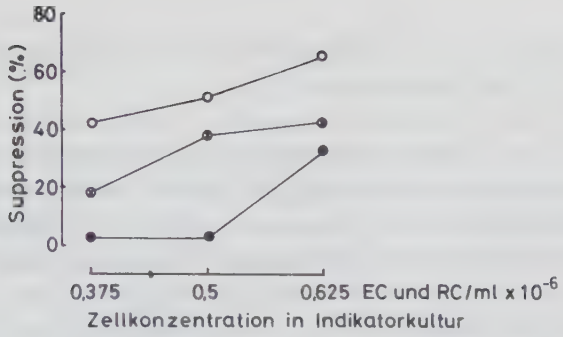


Abb. 9 : Suppression der Proliferation homologer Responderzellen (RC) durch Effektorzellen (EC) nach 45-stündiger Voraktivierung mit 20 µg/ml con A bei einer Zellkonzentration von $2x10^6$ PBMC/ml. 0,375 , 0,5 oder $0,625x10^6$/ml Effektor- bzw. Kontrollzellen wurden mit Responderzellen im Verhältnis 1 : 1 in der Indikatorkultur 70 Stunden lang mit 5 (o) , 25 (⊠) und 125 (●) µg/ml con A inkubiert.

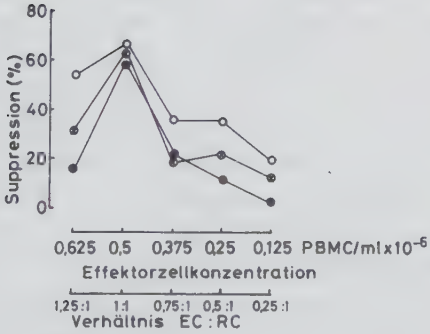


Abb.10 : Suppression in Abhängigkeit vom Verhältnis der Effektorzellen (EC) zu Responderzellen (RC) in der Indikatorkultur. Dargestellt ist die Suppression der Proliferation von $0,5x10^6$ RC/ml nach 70-stündiger Stimulation mit 5 (o) , 25 (⊠) und 125 (●) µg/ml con A durch 0,625 , 0,5 , 0,375 , 0,25 oder $0,125x10^6$ EC/ml nach 45-stündiger Voraktivierung mit 20 µg/ml con A. Das Verhältnis EC : RC variierte zwischen 1,25 : 1 und 0,25 : 1.

1.2.6. Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität vom Spender der Responderzellen

Um eine mögliche Abhängigkeit der Suppressorzellaktivität vom Spender der Responderzellen zu untersuchen, wurde bei 5 Lymphozytenspendern die Suppression der Proliferation autologer und verschiedener homologer Responderzellen durch con A voraktivierte Effektorzellen miteinander verglichen. Die suppressive Wirkung von Effektorzellen eines einzelnen Lymphozytenspenders schwankte zwischen 5 und 20 % bei Verwendung von Responderzellen von 2 bis 4 verschiedenen Spendern. Autologe und homologe Responderzellen wurden gleich stark supprimiert.

2. Normalkollektiv

Das Normalkollektiv umfaßte insgesamt 31 (12 weiblich , 19 männlich) gesunde Blutspender im Alter von 17 bis 68 Jahren. (Durchschnitt : 33±12Jahre) Bei 8 Personen wurde die Lymphozytenstimulierbarkeit durch PHA und NME sowie die Suppressorzellaktivität mehrfach, bei einer Person wöchentlich über einen Zeitraum von 13 Wochen bestimmt.

2.1. Lymphozytenstimulierbarkeit und Suppressorzellaktivität im Normalkollektiv

Der durchschnittlich ^{3}H-TdR-Einbau der Lymphozyten von Normalperson nach 42-stündiger Inkubation mit PHA bei einer Zellkonzentration von $0{,}375 \times 10^{6}$PBMC/ml sowie die Proliferation von $0{,}75 \times 10^{6}$PBMC/ml nach 142-stündiger Aktivierung durch NME ist bei jeweils drei Proteinkonzentrationen in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Aktivität von Suppressorzellen gesunder Spender nach 45-stündiger Vorinkubation von 2×10^{6} PBMC/ml in einer 70-stündigen Responderzellkultur mit $0{,}5 \times 10^{6}$ RC/ml und $0{,}5 \times 10^{6}$ EC bzw. EKC/ml in Abhängigkeit von der Mitogenkonzentration in der Vorkultur und in der Indikatorkultur zeigt Tabelle 3. Für den Vergleich der Reaktivität von Patientenlymphozyten wurde mit 4 µg/ml PHA und 20 µg/ml NME die Proteinkonzentration gewählt, bei denen das Normalkollektiv die geringste Streuung zeigte. Bei 4 µg/ml PHA lagen 84 % , bei 20 µg/ml NME lagen 82 % der Normalpersonen im suboptimalen Bereich. Ebenso zeigten die Lymphozyten des Normalkollektivs nach Voraktivierung mit 20 µg/ml con A und in der Responderzellkultur mit der suboptimalen Dosierung von 5 µg/ml con A die geringste Streuung (27 %).

2.2. Altersabhängigkeit der Lymphozytenstimulierbarkeit und der Suppressorzellaktivität

Eine Korrelation zu Alter oder Geschlecht konnte weder bei der Stimulierbarkeit durch Mitogen oder Antigen noch bei der Suppressorzellaktivität festgestellt werden. (Abbildung 11)

PHA-Konz. [µg/ml]	4	20	100
^{3}H-TdR-Einbau (cpm ± SD)	15.178 ± 5741	15.676 ± 7617	12.198 ± 8529
Anzahl der untersuchten Spender	50	50	25
NME-Konz. [µg/ml]	20	40	80
^{3}H-TdR-Einbau (cpm ± SD)	20.484 ± 9354	23.046 ± 13.695	17.994 ± 11.873
Anzahl der untersuchten Spender	44	43	24

Tab. 2 : Durchschnittlicher ^{3}H-TdR-Einbau bei Normalpersonen nach Stimulation bei verschiedenen Mitogen- und Antigenkonzentrationen.

	20 µg con A/ml Voraktivierung		
con A Konzentration in RC-Kultur	5 µg/ml	25 µg/ml	125 µg/ml
mittlere Suppression ± SD	62,6% ± 17,3%	48,4% ± 18,6%	32,2% ± 19,1%
Anzahl von Probanden	50	47	27

	60 µg con A/ml Voraktivierung		
con A-Konzentration in RC-Kultur	5 µg/ml	25 µg/ml	125 µg/ml
mittlere Suppression ± SD	68,7% ± 24,3%	45,4% ± 20,8%	27,9% ± 17,7%
Anzahl von Probanden	49	48	24

Tab. 3 : Durchschnittliche Suppressorzellaktivität von Normalpersonen nach Voraktivierung mit 20 und 60 µg/ml con A bei 5 , 25 und 125 µg/ml con A in der Responderzellkultur.

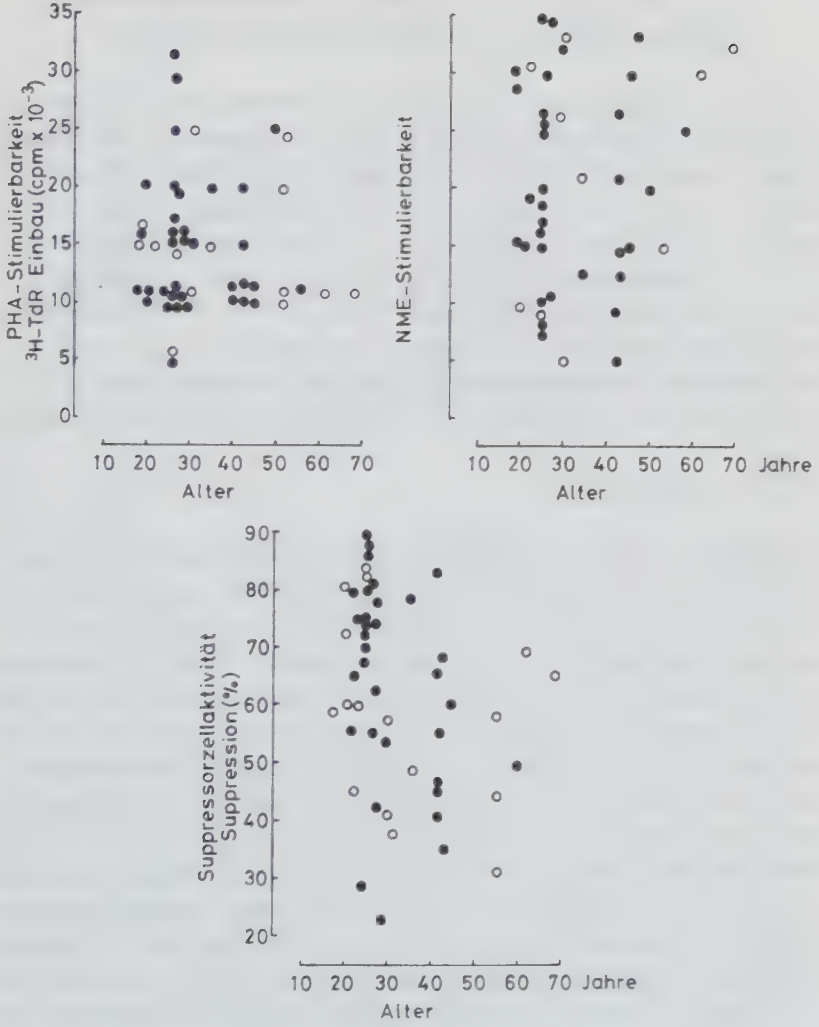


Abb. 11 : Individuelle Streuung der PHA-Stimulierbarkeit, NME-Reaktivität und der Suppressorzellaktivität in Abhängigkeit von Geschlecht (o = weiblich , ● = männlich) und Alter der Testpersonen.

2.3. zeitlicher Verlauf der Lymphozytenstimulierbarkeit und Suppressorzellaktivität bei Normalpersonen

Wiederholungsversuche mit acht Blutspendern zeigten immer beträchtliche Schwankungen aller drei Paramenter. In Abbildung 12 ist der Verlauf der Mitogen- und Antigenstimulierbarkeit sowie der Suppressorzellaktivität über einen Zeitraum von 12 Wochen dargestellt. Bei der Normalperson waren mit 22 % Standardabweichung für Mitogenstimulierbarkeit, 24 % für Antigenstimulierbarkeit und mit 11 % für Suppressorzellaktivität die zeitlichen Schwankungen - wie auch bei Wiederholungsversuchen mit anderen Normalpersonen - geringer als die individuellen Unterschiede im Normalkollektiv.

3. akute Hepatitis

Untersucht wurde die Lymphozytenreaktivität von 32 Patienten mit akuter Hepatitisinfektion, von denen 31 innerhalb von 3 bis 10 Wochen ausheilten. Ein Patient verstarb in der dritten Krankheitswoche an Pfortaderthrombose. Bei 14 Patienten wurde anhand der Hepatitis-Serologie eine Hepatitis-B-Infektion diagnostiziert, bei 8 Patienten ließen sich Hepatitis-A-Viren (HAV) im Stuhl, bzw. hochtitrige HAV-Antikörper in der Ig-M Fraktion im Serum nachweisen, und 10 Patienten wurden nach Ausschluß einer Infektion durch Hepatitis A- , B- , Epstein-Barr- und Zytomegalieviren als akute NANB-Hepatitiden klassifiziert, wobei vier Patienten spontan, sechs Patienten nach Bluttransfusionen erkrankten. Die 32 Patienten zeigten unabhängig von der viralen Genese den für akute Hepatitisinfektionen typischen Verlauf von Transaminasen, Gamma-GT und Bilirubin. Bei Hepatitis-B-Infektionen verschwand HB_s-Antigen in der zweiten bis fünften Krankheitswoche aus dem Serum. Bei 9 Patienten mit verzögert ausheilender Hepatitis waren die SGPT-Werte vier Wochen nach Auftreten des Ikterus noch über 100 IU und normalisierten sich erst zwischen der 6.-10. Woche. Die Testbedingungen zur Bestimmung der Lymphozytenreaktivität und der Suppressorzellaktivität waren standardisiert, so daß die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden konnten.

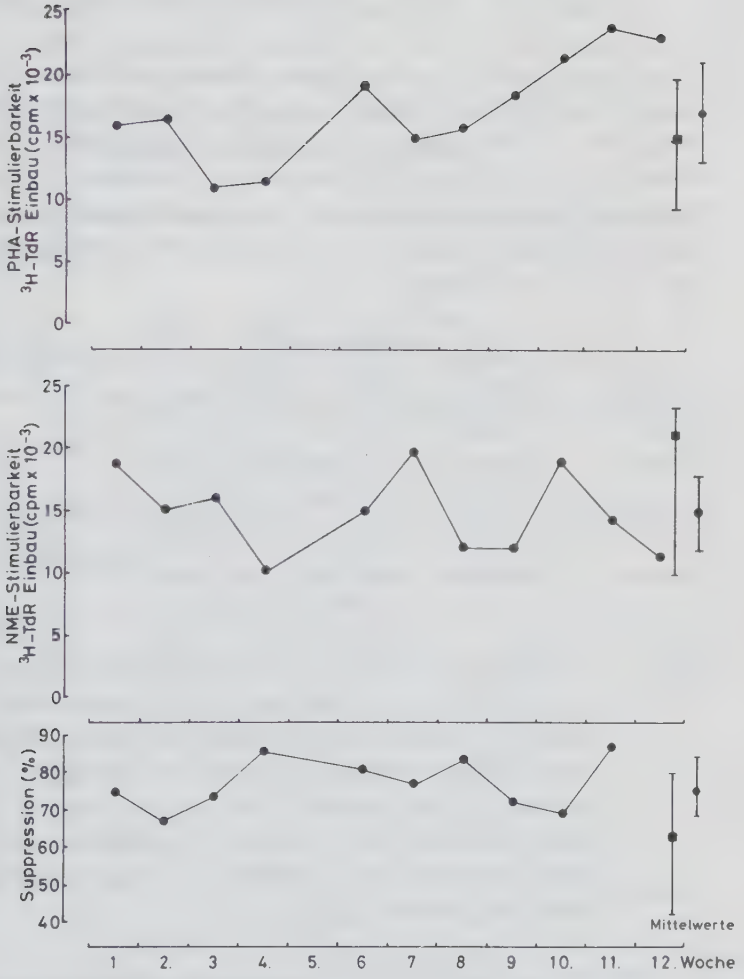


Abb. 12 : Variation der PHA-Stimulierbarkeit, NME-Reaktivität und der Suppressorzellaktivität einer Normalperson innerhalb von 12 Wochen sowie die Mittelwerte für die getestete Normalperson ( ) und für das Normalkollektiv ( ).

3.1. Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Mitogen (PHA) und Antigen (NME) bei Patienten mit akuter Hepatitis

In den ersten beiden Wochen nach Beginn der Virushepatitis Typ A, B und NANB war sowohl die PHA- wie auch die NME-induzierte Lymphozytenproliferation signifikant ($p < 0{,}01$) erniedrigt. Bei allen 9 Patienten mit verzögert ausheilender Hepatitisinfektion ließen sich die Lymphozyten in den ersten drei Wochen nach Ikterus nur sehr schwach stimulieren. (Abbildung 13, Tabelle 4)

	Krankheitswoche			
Verlauf	erste	zweite	dritte	
unkompliziert	6195 ± 2807 (n=13)	10397 ± 2266 (n=7)	10087 ± 2322 (n=8)	cpm nach PHA-Stimulation
verzögert	6240 ± 4373 (n= 5)	8907 ± 3216 (n=5)	13714 ± 7583 (n=3)	
unkompliziert	3828 ± 3771 (n=12)	4956 ± 3344 (n=7)	13477 ± 5347 (n=7)	cpm nach NME-Stimulation
verzögert	2795 ± 3327 (n = 5)	2849 ± 4632 (n=5)	1823 ± 1499 (n=3)	

Tab. 4 : Durchschnittliche Lymphozytenproliferation in cpm bei Patienten mit unkompliziert verlaufender und verzögert ausheilender Hepatitis nach Stimulation unter Standardbedingungen mit PHA-Mitogen und NME-Antigen in der ersten, zweiten und dritten Woche nach Auftreten des Ikterus. (Normalkollektiv : 15178 ± 5741 cpm nach PHA-Stimulation , 20484 ± 9354 cpm nach NME-Stimulation)

Die Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten durch NME normalisierte sich in den meisten Fällen später als die Mitogenantwort. (Abbildung 14) Nur noch zwei von sieben Patienten mit unkompliziert ausheilender Hepatitisinfektion zeigten in der dritten Krankheitswoche eine verminderte NME-induzierte Proliferation. Bei diesen Patienten konnte eine Normalisierung der NME-Stimulierbarkeit nach 5 bzw. 7 Krankheitswochen festgestellt werden.

Dagegen wurde bei allen Patienten mit verzögert ausheilender Hepatitis in der dritten Krankheitswoche eine deutlich reduzierte NME-Reaktivität beobachtet. Bei einem Patienten war nach acht Wochen noch keine Normalisierung der NME-Stimulierbarkeit eingetreten; eine weitere Verlaufskontrolle in der 11. Krankheitswoche ergab normale Werte.

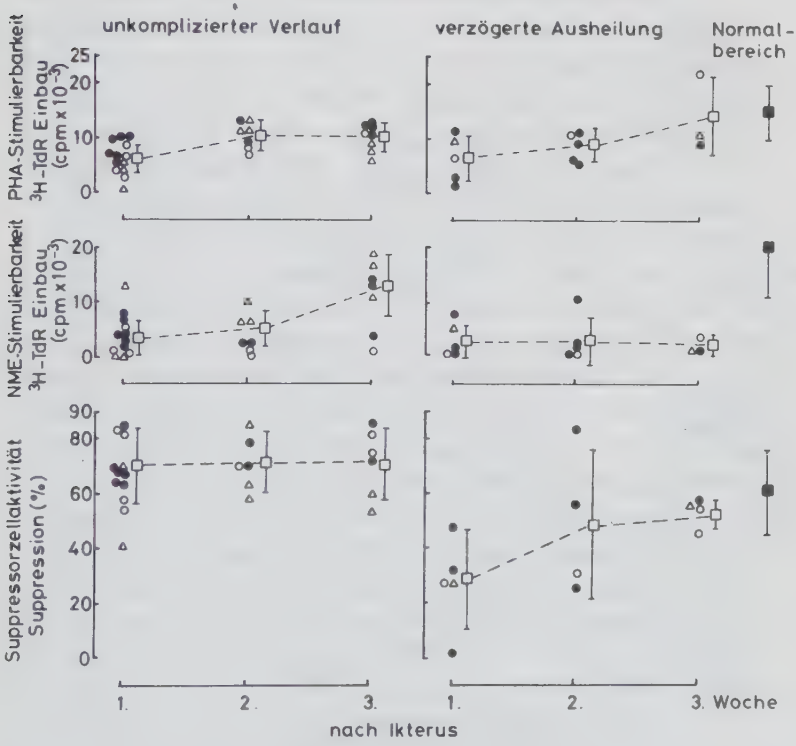


Abb. 13 : Unter Standardbedingungen bestimmte PHA- und NME-induzierte Proliferation sowie Suppressorzellaktivität bei Patienten mit unkompliziert verlaufender (n=23) und verzögert ausheilender (n=9) akuter Virushepatitis Typ A (○ , n=8) , B (● , n=14) und NANB (△ , n=10) in der ersten, zweiten und dritten Woche nach Auftreten des Ikterus im Vergleich zum Normalkollektiv (▮).

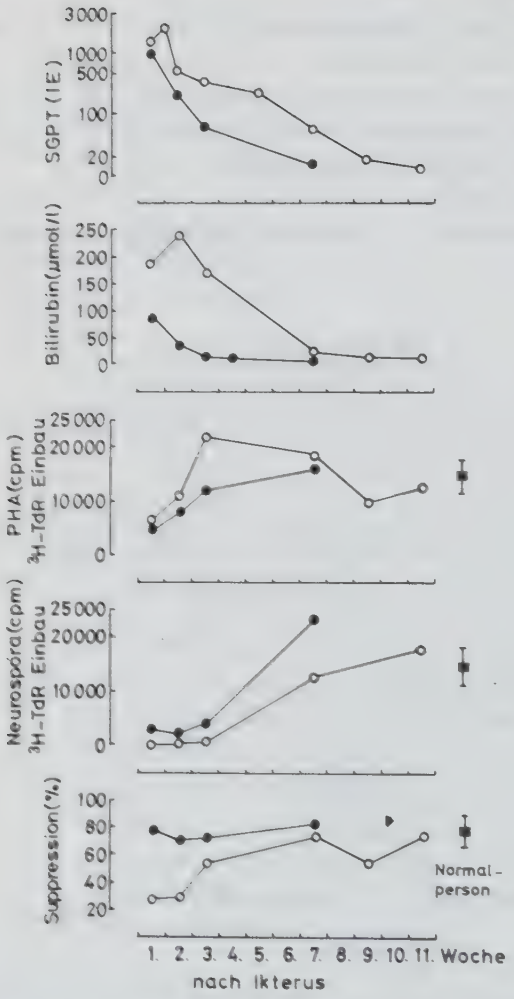


Abb. 14 : Verlaufsbestimmungen von SGPT, Bilirubin, PHA-Stimulierbarkeit, NME-Reaktivität und Suppressorzellaktivität bei unkompliziert (●) und verzögert (o) ausheilender akuter Hepatitis. Dargestellt ist außerdem der Mittelwert des zellulären Parameters bei einer parallel getesteten Normalperson (▪).

3.2. Suppressorzellaktivität bei akuter Hepatitis

Bei den 23 Patienten mit unkompliziert verlaufender akuter Hepatitis war unabhängig von der viralen Genese mit durchschnittlich 70,3±14,2 % in der ersten, mit 71,3±11,0 % in der zweiten und mit 71,6±13,4 % Suppression in der dritten Krankheitswoche eine höhere mittlere Aktivität als beim Normalkollektiv (62,6±17,3 %) nachweisbar. (Abbildung 13) Bei dem einzigen Patienten mit leicht erniedrigter Suppressorzellaktivität in dieser Gruppe konnte eine zweite Bestimmung nicht vorgenommen werden; der klinische Verlauf war jedoch unauffällig. Dagegen war die Suppressorzellfunktion bei Patienten mit verzögert ausheilender Hepatitis in der ersten Krankheitswoche signifikant reduziert (27,8±17,7 % Suppression , $p<0,01$) : Bei vier Patienten war die Suppressorzellaktivität deutlich, bei einem Patienten grenzwertig erniedrigt. In der zweiten Krankheitswoche supprimierten zwei von vier Patienten mit verzögert ausheilender Hepatitis normal, in der dritten Krankheitswoche zeigte noch ein Patient leicht erniedrigte Suppression. Kontrolluntersuchungen vier Wochen nach Ikterus oder später ergaben eine normale Suppressor-T-Zell-Funktion. Der Verlauf der Suppressorzellaktivität bei einem Patienten mit unkompliziert verlaufender sowie bei verzögert ausheilender akuter Hepatitis ist in Abbildung 14 dargestellt.

4. chronische Hepatitis

Insgesamt wurden 49 Patienten mit chronischer Hepatitis untersucht. In 17 Fällen entwickelte sich eine chronisch aktive Hepatitis (caH) aus einer akuten Hepatitis-B-Infektion. Diese Patienten waren alle HB_s-Antigen positiv, bei sechs Patienten ließ sich HB_e-Antigen nachweisen. Bei 18 Patienten wurde aufgrund negativer Hepatitis-A- und B- sowie negativer Zytomegalie- und Epstein-Barr-Serologie eine chronische NANB-Hepatitis diagnostiziert, die in 11 Fällen sporadisch und in 7 Fällen nach Bluttransfusionen auftrat. Vierzehn Patienten, davon 13 weiblich, zeigten klassische Autoimmunphänomene wie Hauterscheinungen, Hypergammaglobulinämie und organunspezifische Autoantikörper beim histologischen Bild einer chronisch aggressiven Hepatitis und wurden deshalb als autoimmune "lupoide" chronische Hepatitis klassifiziert.

4.1. Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Mitogen (PHA) und Antigen (NME) bei Patienten mit chronischer Hepatitis

Trotz Anwendung streng standardisierter Testbedingungen zeigte sich in der Gruppe der chronischen B- und NANB-Hepatitiden eine sehr unterschiedliche Reaktivität der Lymphozyten gegenüber PHA-Mitogen und NME-Antigen. (Abbildung 15) Die mittlere Stimulierbarkeit in den einzelnen Patientengruppen lag zwar immer unter dem Durchschnitt des Normalkollektivs, doch nur jeweils etwa die Hälfte der Patienten zeigte eine erniedrigte PHA- bzw. NME-Stimulierbarkeit. Am schlechtesten war mit durchschnittlich 8016 ± 4964 cpm die Gruppe der autoimmunen chronischen Hepatitiden durch PHA zu aktivieren, doch auch bei diesen Patienten war in acht von vierzehn Fällen eine normale Stimulierbarkeit durch PHA vorhanden. Die durch NME induzierte Proliferation war bei Patienten mit autoimmuner chronischer Hepatitis mit 5720 ± 3288 cpm signifikant ($p < 0{,}01$) reduziert.

Acht von elf Patienten mit sporadisch auftretender chronischer NANB-Hepatitis zeigten eine erniedrigte NME-Reaktivität. (Abbildung 15) Eine Abhängigkeit der PHA- oder NME-Stimulierbarkeit von der histologischen Aktivität oder von laborchemischen bzw. serologischen Parametern war nicht feststellbar.

4.2. Suppressorzellaktivität bei chronischer Hepatitis

Bei Patienten mit chronischer HB_s-Antigen positiver Hepatitis wurden unterschiedliche Suppressorzellaktivitäten gemessen (Abbildung 15), wobei auch dieser immunologische Parameter nicht mit der Histologie des Leberpunktates, mit laborchemischen Werten, mit serologischen Befunden oder mit der klinischen Aktivität korrelierte. Ebenso zeichnet Patienten mit chronischer posttransfusioneller NANB-Hepatitis eine völlig uneinheitliche Suppressorzellfunktion aus. Im Gegensatz dazu läßt sich die Gruppe der sporadisch auftretenden chronischen NANB-Hepatitiden statistisch deutlich ($p < 0{,}005$) von der Gruppe der autoimmunen chronischen Hepatitiden abgrenzen. Mit einer Ausnahme hatten alle Patienten mit sporadisch auftretender chronischer NANB-Hepatitis eine normale Suppressorzellfunktion. Dagegen wurde bei 8 von 9 Patienten mit autoimmuner chronischer Hepatitis eine deutlich reduzierte Suppressorzellaktivität festgestellt. (Abbildung 15) In dieser Patientengruppe ließen sich bei allen Personen hochtitrige Autoantikörper nachweisen. Autoantikörper waren außerdem bei 4 von 17 Patienten mit HB_s-Antigen positiver chronischer Hepatitis nachweisbar. Drei Patienten mit Autoantikörpern hatten gleichzeitig eine reduzierte Suppressorzellaktivität. In dieser Gruppe der HB_s-Antigenpositiven caH wurden allerdings auch drei Patienten mit reduzierter Suppressorzellfunktion beobachtet, ohne daß Autoantikörper nachzuweisen waren. (Abbildung 15)

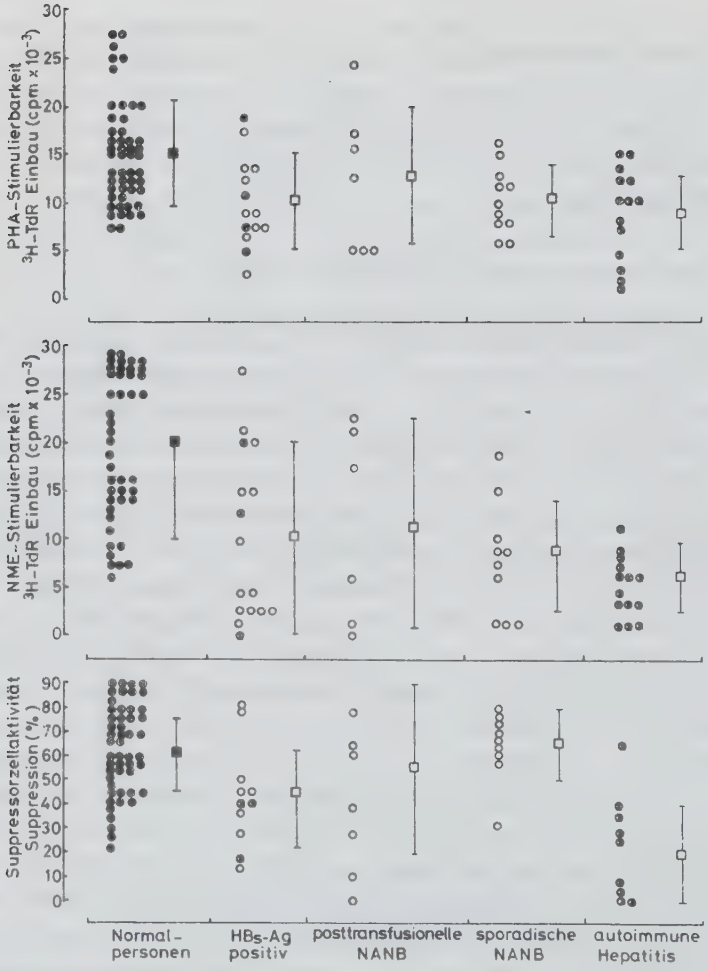


Abb. 15 : Unter Standardbedingungen bestimmte PHA- bzw. NME-induzierte Proliferation sowie Suppressorzellaktivität bei Patienten (o) mit HB_s-Antigen-positiver (n=17) , posttransfusioneller (n=7) und sporadischer (n=11) chronischer NANB-Hepatitis und mit autoimmuner chronischer Hepatitis (n=14) im Vergleich zu Normalpersonen (● , n=31). Patienten mit hohen Autoantikörpertitern sind gekennzeichnet (⊠).

4.3. Prognostische Relevanz der Lymphozytenfunktionen bei chronischer Hepatitis

Bei 21 Patienten mit chronischer Hepatitis wurde ein bis eineinhalb Jahre nach Bestimmung der Lymphozytenfunktionen die Krankheitsaktivität erneut erfaßt. Eine Klassifizierung erfolgte aufgrund der Transaminasenaktivität, Bilirubinkonzentration und aufgrund allgemeiner Krankheitssymptome. Eine erneute Leberbiopsie war in keinem Fall vorgenommen worden. Bei 8 von 9 Patienten mit normaler Suppressorzellaktivität hatte sich das Krankheitsbild gebessert, bei einer Patientin war keine Änderung ihres Zustandes eingetreten. Bei 12 Patienten mit reduzierter Suppressorzellaktivität, bei denen zum Zeitpunkt der Lymphozytenuntersuchung keine immunsuppressive Therapie bestand, war nach ein bis eineinhalb Jahren in 8 Fällen das Krankheitsbild unverändert, wobei drei dieser Patienten mittlerweile immunsuppressiv behandelt wurden. Bei vier Patienten mit reduzierter Suppressorzellaktivität hatte sich - in zwei Fällen unter immunsuppressiver Therapie - das Krankheitsbild verschlechtert.

Die Ergebnisse der PHA-Stimulierbarkeit und NME-Reaktivität ließen keinen Zusammenhang zum klinischen Verlauf der chronischen Hepatitis erkennen.

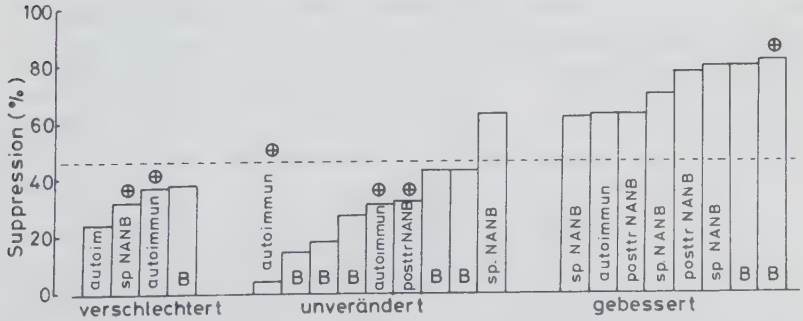


Abb. 16 : Krankheitsbild 1 bis 1,5 Jahre nach Bestimmung der Suppressorzellfunktion im Vergleich zur gemessenen Aktivität. Patienten, die inzwischen immunsuppressiv behandelt wurden, sind gekennzeichnet (⊕).

5. Korrelationsstudien

Statistische Analysen ergaben, daß keine Beziehung besteht zwischen folgenden Parametern:

PHA-Stimulierbarkeit
NME-Reaktivität
con A-induzierte Suppressorzellaktivität
Seruminhibitionsfaktoren (SIF)
Gamma-Globulinspiegel
Transaminasenaktivität
Bilirubinspiegel

Die Korrelationskoeffizienten lagen immer unter 0,5. Im χ^2-Test konnte nach Klassifizierung in die Kategorien "pathologisch" und "normal" anhand der Werte des Normalkollektivs eine Assoziation der PHA- und NME-Stimulierbarkeit bei Patienten mit akuter Hepatitisinfektion in der ersten Woche nach Ikterus festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient lag in dieser Gruppe bei 0,11, so daß eine direkte Abhängigkeit beider zellulärer Parameter nicht anzunehmen ist. In Abbildung 17 ist die Beziehung zwischen PHA- und NME-Stimulierbarkeit bei reduzierter und normaler Suppressorzellaktivität sowie die Beziehung zwischen PHA-Stimulierbarkeit und Seruminhibitionsfaktoren (SIF) im Blut dieser Patienten dargestellt.

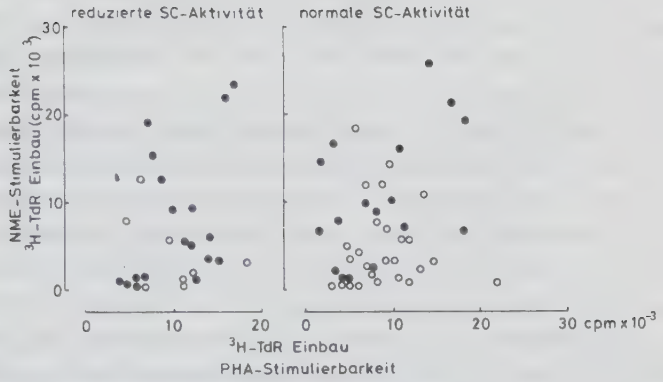


Abb. 17a : Beziehung zwischen PHA- und NME-induzierter Proliferation bei akuter (o) und chronischer (•) Hepatitis für Patieten mit reduzierter (Korrelationskoeffizient : 0,19) und normaler (Korrelationskoeffizient : 0,04) Suppressorzellaktivität.

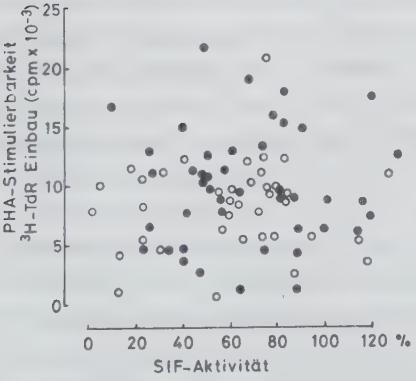


Abb. 17b : Hemmung der Proliferation normaler Lymphozyten durch Inhibitionsfaktoren (SIF) im Serum von Patienten mit akuter (o) und chronischer (•) Hepatitis im Vergleich zur PHA-Stimulierbarkeit der Lymphozyten dieser Patienten. (Korrelationskoeffizient : 0,14)

D Diskussion

Immunreaktionen spielen eine entscheidende Rolle im Ablauf zahlreicher Krankheiten. Über die Regulation der Immunantwort wurden im Tiermodell, insbesondere der Maus, vielversprechende Erkenntnisse gewonnen. Wenig bekannt ist über den Ablauf und die Regulation der Immunreaktion beim Menschen. Viele widersprüchliche Ergebnisse erschweren eine Interpretation, und unterschiedliche Testbedingungen schränken die Vergleichbarkeit der Untersuchungen ein.

Um eine Einordnung der vorliegenden Untersuchung über Lymphozytenproliferation und Suppressorzellaktivität bei akuter und chronischer Hepatitis zu ermöglichen, soll zunächst das angewandte Testsystem diskutiert werden:

Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten wurde jeweils in drei Mitogen- bzw. Antigenkonzentrationen bestimmt. Supressorzellen wurden mit zwei con A-Konzentrationen voraktiviert und ihre suppressive Aktivität durch den Vergleich mit nicht aktivierten, vorinkubierten Zellen in dreifachen Ansätzen in Kokulturen mit Responderzellen bestimmt, die ebenfalls mit drei Mitogenkonzentrationen stimuliert wurden. Angegeben wurde jeweils eine repräsentative Konzentration für Mitogenstimulierbarkeit, Antigenreaktivität und Suppressorzellaktivität, da sich die Ergebnisse bei höheren und niedrigeren Konzentrationen statistisch nicht unterschieden.

Bei den hier angegebenen Konzentrationen zeigten Normallymphozyten die geringste Streuung, und Unterschiede zu Patientengruppen waren am deutlichsten zu beobachten (16, 123).

Die Lymphozytenkulturen wurden zu einem Zeitpunkt geerntet, zu dem die Zellen noch nicht maximal proliferierten, und so die Messung der radioaktiv markierten DNS als Äquivalent für die tatsächliche Mitoserate noch nicht durch DNS beeinträchtigt werden konnte, die durch Zelluntergang oder Sättigung freigesetzt wird (16,17,154).

Bei der Bestimmung der Lymphozytenreaktivität erhielten die Kulturen immer gepooltes Humanserum, um mögliche Variationen durch hemmende oder fördernde Serumfaktoren auszuschließen (158).

Das Maximum der Dosis-Wirkungskurve lag für verschiedene Lymphozytenspender bei unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Mitogens bzw. Antigens (154,158). Für die meisten Spender waren die in den Abbildungen wiedergegebenen Konzentrationen suboptimal.

Durch das Vorpipettieren der Testplatten und Kulturröhrchen wurde sichergestellt, daß alle Lymphozyten immer im exakt selben Milieu kultiviert wurden (9). Durch mehrfaches Zählen der Zellen und die genaue Einhaltung der Inkubationszeiten wurden mögliche Variationen durch diese Faktoren auf ein Minimum reduziert (79,158).

Trotzdem wurden bei Mitogen- und Antigenstimulierbarkeit sowie bei der Suppressorzellaktivität beträchtliche individuelle und zeitliche Unterschiede festgestellt, die auch von anderen Autoren beschrieben sind.

Da alle Blutproben zwischen 8 und 9 Uhr abgenommen wurden, können diese Schwankungen nicht durch eine circadiane Rhythmik verursacht sein (57,86).

In den eigenen Untersuchungen konnte keine Korrelation der Lymphozytenfunktionen zu Alter oder Geschlecht festgestellt werden; im untersuchten Kollektiv waren allerdings nur wenige Personen über 65 Jahre vertreten, bei denen von anderen Autoren (70,82,119,126) signifikant reduzierte Lymphozytenreaktivitäten beobachtet wurden.

Die Streuung der Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten gesunder Spender kann mit der biologischen Varianz erklärt werden, die durch eine aktuelle, unterschiedliche Zusammensetzung der Immunzellpopulationen im peripheren Blut und deren Funktion bedingt zu sein scheint.

Diese Immunkompetenz wird durch immunologische Mediatoren wie auch durch hormonelle Faktoren moduliert und kann bereits im Ablauf banaler Infektionen modifiziert sein (27,35).

Trotz erheblicher Variationen der Stimulierbarkeit im Normalkollektiv konnten signifikante Unterschiede zu den Patientengruppen festgestellt werden.

Mitogen induzierte Proliferation war bei Patienten mit akuter Hepatitis unabhängig von der viralen Genese während der ersten Krankheitswoche signifikant reduziert. Eine Normalisierung wurde in der zweiten Krankheitswoche beobachtet, wenn die Erkrankung problemlos ausheilte, während bei verzögertem Verlauf eine normale PHA-Stimulierbarkeit erst später auftrat. Alle akuten Hepatitisinfektionen heilten aus, die Patienten zeigten nach vollständiger Genesung eine normale Lymphozytenproliferation nach PHA-Aktivierung.

Patienten mit chronischer Hepatitis reagierten sehr unterschiedlich auf das Mitogen. Das Ausmaß der Proliferation war unabhängig vom histologischen, biochemischen, serologischen oder klinischen Bild der Erkrankung. Diese Ergebnisse werden sowohl bei chronischer wie auch bei akuter Hepatitis in einem vergleichbaren Testsystem von Feighery et al. (60) , Thestrup et al. (187) und Wands et al. (199) bestätigt. Bei der Bestimmung der Mitogen induzierten Proliferation in autologem Serum, das immunsuppressive Faktoren enthalten kann (24,138,206), finden Wands et al. (199) eine normale, Sodomann et al. (175) sogar eine gesteigerte Reaktivität der Lymphozyten gegenüber PHA bei Patienten mit akuter Hepatitis. Newble et al. (140) berichten von erniedrigter PHA-Stimulierbarkeit für 6-8 Wochen nach akuter Hepatitisinfektion. Tabelle 5 ermöglicht den Vergleich der eigenen Standardbedingungen mit den Testbedingungen, bei denen andere Autoren die Mitogen induzierte Lymphozytenproliferation bestimmt haben.

PHA	Mitogenkonz (µg/ml)	Zellkonz (x10 cells cells/ml)	Inkubationszeit Stunden	Medium
Feighery et al 1980	3,1 2 5	0,5	48	RPMI 1640 10% fetales Kalberserum
Newble et al 1975	ohne genaue Angabe	20% Vollblut	92	40% Medium 199 40% autologes Serum
Sodomann et al 1979	5-500	0,75	68	Medium 199 15% autologes Serum
Thestrup et al 1976	1	0,5	72	Medium 199 15% gepooltes homologes Serum
Wands et al 1975	ohne genaue Angabe	1	72	RPMI 1640 +10% fetales Kalberserum +autologes+homologes Serum
eigene Untersuchung	4 20 100	0,375	42	RPMI 1640 20% gepooltes homologes Serum

Tab. 5 : Literaturvergleich von Kulturbedingungen zur Bestimmung der Mitogenstimulierbarkeit von Lymphozyten.

Während PHA eine große Anzahl von T-Zellklonen (50 %) ohne vorherige Sensibilisierung stimuliert, wird die Reaktivität gegenüber Antigen erst nach einer Sensibilisierung nachweisbar (9,28,81,179). So wird bei zahlreichen Infektionen wie Herpes simplex (156) , Herpes zoster (15) , Mumps (89, 124) , Windpocken (159) , Röteln (173) , Epstein-Barr (64,99) , Zytomegalie (63,132) und Hepatitis (42,189) die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort gegenüber dem jeweiligen Antigen beobachtet. Bei Normalpersonen findet man eine gute Stimulierbarkeit durch diejenigen Antigene, die ubiquitär vorkommen wie Candida albicans, Staphylococcus aureus oder E.coli (39,79,148). Man kann annehmen, daß es sich bei NME ebenfalls um ein ubiquitäres Antigen handelt, jedenfalls zeigten alle gesunden Spender eine stark ausgeprägte Lymphozytenproliferation, induziert durch NME. Die verwendete Präparation submitochondrialer Partikel enthält Membranantigene, die möglicherweise mit anderen ubiquitären Mikroorganismenmembranen strukturelle Übereinstimmung zeigen.

Ähnliche, jedoch stärker ausgeprägte Unterschiede fanden sich bei der Stimulation der Patientenlymphozyten mit dem Antigen aus Neurospora crassa. Bei Patienten mit akuter Hepatitis ließen sich die Lymphozyten während der ersten beiden Krankheitswochen nur sehr schwach zur Proliferation anregen. Eine Normalisierung war erst ab der dritten Krankheitswoche zu beobachten.

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis wurden sehr unterschiedliche Lymphozytenaktivitäten nach Antigenstimulation festgestellt. Sowohl das vollständige Fehlen der Stimulierbarkeit wie auch Hyperreaktivität war zu beobachten. Patienten mit autoimmuner "lupoider" Hepatitis allerdings zeigten im Vergleich zu Normalpersonen und zu anderen Patienten mit chronischer Hepatitis nicht-autoimmuner Genese signifikant reduzierte Antigenstimulierbarkeit.

Vergleichbare Stimulationsversuche mit NME-Antigen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Gegenüber Tuberkulin-Antigen haben Stanciu et al. (177) eine Reaktionslosigkeit von Lymphozyten während der akuten Phase von Hepatitisinfektionen und Cloos et al. (34) während Lepraerkrankungen beobachtet.

Da für die Stimulation der Lymphozyten durch NME hohe Protein- und Zellkonzentrationen sowie lange Inkubationszeiten erforderlich sind, kann davon ausgegangen werden, daß nur sehr wenige Zellklone zur Proliferation angeregt werden können. Die Proliferation weniger spezifischer Zellklone ist typisch für die lymphozytäre Stimulation durch Antigene im Gegensatz zur unspezifischen Aktivierung vieler Lymphozyten durch Mitogene, die bereits nach zwei bis drei Tagen nachweisbar ist (81).

Durch PHA und NME scheinen verschiedene Zellklone aktiviert zu werden (81), in beiden Fällen unabhängig von Serumsfaktoren. Es wurden Personen getestet, deren Lymphozyten durch PHA stark, durch NME dagegen überhaupt nicht zur Proliferation angeregt werden konnten und umgekehrt. Statistisch besteht kein Zusammenhang zwischen PHA- und NME-Stimulierbarkeit.

Die Reduktion der PHA- und NME-Stimulierbarkeit bei Patientenlymphozyten ist nicht darauf zurückzuführen, daß mit 4 µg PHA/ml und 20 µg NME/ml in den meisten Fällen eine suboptimale Stimulierung erfolgt (16), da Patienten mit reduzierter Reaktivität bei diesen Konzentrationen auch nach optimaler und supraoptimaler Aktivierung einen deutlich niedrigeren ^{3}H-TdR-Einbau als Normalpersonen zeigten. Es handelt sich bei den nachgewiesenen Unterschieden also nicht nur um eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Bei mehreren Autoren ist umstritten, ob Abweichungen eines Probandenkollektivs von Normalpersonen im suboptimalen oder im optimalen Bereich zu erfassen sind (16,71,155,210). Bei verschiedenen Untersuchungen waren signifikante Unterschiede der Lymphozytenproliferation vor allem in suboptimaler Mitogen- bzw. Antigenkonzentration nachweisbar (16, 60,184). Eine Erklärung könnte sein, daß bei suboptimaler Aktivierung so wenige Zellklone aktiviert werden, daß geringe Unterschiede der Lymphozytenstimulierbarkeit erfassbar werden, die bei optimaler Stimulation überspielt werden (60,123).

Die erniedrigt gemessene Lymphozytenproliferation nach PHA- bzw. NME-Stimulation ist wahrscheinlich der Ausdruck einer funktionellen Veränderung der Lymphozyten selbst (74,140) und läßt sich prinzipiell nicht auf eine geringere Anzahl von T-Zellen (12,78) oder auf humorale oder zelluläre Suppression im Blut der Patienten zurückführen, obwohl solche Faktoren nachgewiesen sind (24,138,139,206).

Es wurden Personen mit reduzierter Lymphozytenstimulierbarkeit beobachtet, bei denen sich weder inhibitorische Serumfaktoren noch eine gesteigerte Suppressorzellaktivität nachweisen ließen. Auf der anderen Seite zeigten Personen mit gesteigerter Suppressorzellaktivität und/oder deutlichen Hemmfaktoren im Serum in vielen Fällen eine normale Lymphozytenstimulierbarkeit.

Ein Zusammenhang zwischen Lymphozytenproliferation, Suppressorzellaktivität und Serum-Inhibitionsfaktoren (SIF) konnte auch statistisch ausgeschlossen werden. Eine direkte Blockade von Rezeptoren für PHA oder NME an der Lymphozytenmembran (72) durch Serumfaktoren ist nicht anzunehmen, da hemmende Serumfaktoren durch die Waschgänge entfernt werden (86,140,143).

Viele Autoren diskutieren, ob eine reduzierte Proliferationsfähigkeit auf einer veränderten Rezeptorenfunktion für das Stimulans oder auf einer intrazellulären Veränderung beruht (8,28,41,52,143).

Die einheitlich reduzierte Reaktivität gegenüber Mitogen und ubiquitärem Antigen während der akuten Phase von Hepatitisinfektionen mit unterschiedlicher viraler Genese wird am besten als Zustand der Anergie bezeichnet (53,96,103). Anergie ist im Gegensatz zur Toleranz die zeitlich begrenzte Reaktionslosigkeit immunkompetenter Zellen auf viele Antigene und Mitogene (28,96). Es ist bisher nicht geklärt, warum im Ablauf zahlreicher Infektionen eine anergische Reaktionslage der Lymphozyten eintritt (4,96,98,131,151,165,177, 207). Da ein anergischer Zustand auf zellulärer Ebene eine Unfähigkeit zur Reduplikation von lymphozytärem Kernmaterial bedeutet, wird bei intralymphozytären Infektionen diskutiert, ob durch die anergische Reaktionslage auch die Replikation viraler DNS verhindert oder verzögert wird (99,117,151, 205). Andernseits wird diskutiert, ob ein anergischer Zustand im Ablauf von Infektionen nicht deshalb eintreten muß, um eine effektivere, spezifische Reaktion gegen das infizierende Agens zu ermöglichen, aber eine Mitaktivierung von Zellklonen, die gegen andere Antigensysteme gerichtet sind, zu verhindern (18,131,203).

Das Vorkommen einer spezifischen Sensibilisierung läßt sich bei vielen Infektionen durch Bestimmung der Lymphozytenreaktivität gegenüber dem jeweiligen Antigen mit Hilfe von Stimulationsversuchen nachweisen (11) und ist bei der Maus mit einer anergischen Reaktionslage assoziiert (4,18,111,115,203).

Die spezifische Sensibilisierung von Lymphozyten gegenüber HB_s-Antigen wurde von Tong (189) , deGast (42) , Lee (112) und Kremastinou (107) während oder unmittelbar nach Ausheilung einer Hepatitisinfektion beobachtet. Da diese spezifische Reaktivität zeitlich mit dem Auftreten spezifischer Antikörper zusammenfällt, kann angenommen werden, daß die spezifische Sensibilisierung der Lymphozyten eine Voraussetzung ist für eine erfolgreiche Elimination der Viren, bzw. für das komplikationslose Ausheilen von Hepatitis-Infektionen.

Wenn eine Sensibilisierung gegenüber HB_s-Antigen nach Infektion nicht erfolgt, ist eine Persistenz der Viren im Organismus möglich. Bei asymptomatischen Carriern bleibt eine entzündliche Reaktion gegenüber den Wirtszellen des Virus aus (48,116,189). Die von Nielsen et al. (142) und Agarwal et al. (2) beobachtete, gut ausgeprägte Reaktivität gegenüber Mitogen zeigt, daß ein anergischer Zustand bei diesen Personen trotz Virämie nicht eintritt. Möglicherweise kann bei asymptomatischen Carriern aus diesem Grund eine spezifische Sensibilisierung und damit eine adäquate Viruselimination nicht erfolgen (48,112, 189). Ohne unspezifische Abwehrmechanismen kann sich deshalb eine symbiotische Existenz der Viren in den Hepatozyten entwickeln (46). Andernseits können Immunreaktionen mit dem Ziel, Virus-befallene Hepatozyten zu zerstören, auftreten und zum histologischen Bild einer chronisch aktiven Hepatitis führen, wenn durch das Ausbleiben einer spezifischen Sensibilisierung eine adäquate Elimination nicht erfolgt. Unter welchen Umständen diese Immunreaktionen eintreten und zur chronischen Hepatitis führen, bzw. ausbleiben, wie bei asymptomatischen Carriern, hängt möglicherweise von der Funktion spezifischer Suppressor-T-Zellen ab (48,97).

Die uneinheitliche Reaktivität der Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis deutet an, daß für die Entstehung des histologischen Bildes einer chronisch aggressiven Hepatitis verschiedene Störungen des Immunsystems verantwortlich sein können.

Im untersuchten Krankengut wurden sowohl anergische Zustände mit fehlender Stimulierbarkeit durch Mitogen und Antigen wie auch völlig normale Reaktivitäten sowie alle möglichen Kombinationen hinsichtlich der Ausprägung und der Spezifität beobachtet. Bei Patienten mit reduzierter Stimulierbarkeit kann angenommen werden, daß trotz anergischer Reaktionslage eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber den Viren nicht erfolgt und somit eine adäquate Elimination ausbleibt (54).

Bei Patienten mit normaler Stimulierbarkeit dagegen scheint die Persistenz der Viren und damit die Fortdauer der entzündlichen Prozesse in der Leber deshalb ermöglicht, weil eine Sensibilisierung gegenüber den Viren ohne anergische Reaktionslage der Zellen nicht erfolgen kann. Die beobachtete Erniedrigung der NME-Stimulierbarkeit bei Patienten mit autoimmuner chronischer Hepatitis kann weniger als Störung des Immunsystems im Rahmen der Antigenelimination verstanden werden, zumal bei diesen Patienten eine virale Genese der Erkrankung sehr unwahrscheinlich ist. Mangelnde Antigenreaktivität könnte bei diesen Patienten eher Ausdruck eines allgemeinen Immundefekts sein, der in der Pathogenese von autoimmunen Hepatitiden anzunehmen ist (38,81,84,203).

Mit der con A induzierten Suppressorzellaktivität wurde bei Normalpersonen und Hepatitiskranken eine Lymphozytenfunktion untersucht, deren regulativer Einfluß auf das Immunsystem heute weitgehend unbestritten ist (13,67). Wie bei der Bestimmung der Lymphozytenproliferation konnten durch hohe Standardisierung der Testbedingungen methodisch bedingte Variationen auf ein Minimum reduziert werden (13). Diese Standardbedingungen sind in Tabelle 6 im Vergleich zu den Testbedingungen in anderen Untersuchungen dargestellt. Die beträchtliche Streuung der Normalpersonen kann ebensowenig wie signifikant abweichende Suppressorzellaktivitäten in den Patientengruppen auf Serumfaktoren oder mangelnde Aktivierbarkeit der Responderzellen zurückgeführt werden (32).

Die in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Veränderungen sind Ausdruck einer veränderten regulativen T-Zell-Funktion (13,77,85,160). Suppressive Eigenschaften konnten im hier verwendeten Testsystem in der B-Zellfraktion nicht festgestellt werden.

	Voraktivierungsindikator			Indikatorkultur				
	Zellkonz ($\times 10^6$ PBMC/ml)	con A (µg/ml)	Inkubationszeit (h)	Zellkonz der RC ($\times 10^6$ RC/ml)	Verhältnis ER:RC	Mitogenkonz (µg/ml)	Inkubationszeit (h)	Responderzellen - spender
Hodgson et.al 1978	3-5	6	48	0,5	1:1	7,5	72	homolog
Chisari et.al 1981	1	5	96	0,66	1:2	1	72	autolog
Tremolada et.al 1980	1	20	24	keine getrennte Indikatorkultur				autolog
Nonomura et.al 1982	2	10	48	0,5	1:1	10	72	homolog
Kashio et.al 1981	2	10	48	0,5	1:1	4,5	120	homolog
Zettermann 1981	3-5	10	48	0,5	1:1	10	72	homolog
eigene Untersuchungen	2	20	45	0,5	1:1	5 µg	72	homolog

Tab. 6 : Literaturvergleich der Testbedingungen zur Bestimmung der Suppressorzellaktivität von Lymphozyten.

Untersuchungen im Tiermodell haben zu den Vorstellungen geführt, daß bei intakter Immunfunktion bestimmte Zellklone durch regulative T-Zellen spezifisch gehemmt werden (106, 183). Bei akuten Infektionen kann diese suppressive T-Zell-Funktion physiologischerweise reduziert oder aufgehoben sein (94) und durch eine Enthemmung normalerweise verbotener Zellklone im Sinne eines Verlustes der Selbsttoleranz (84, 116) zu vorübergehenden Autoimmunreaktionen führen. Ebenso können immunregulatorische T-Zellen den Ausbruch autoimmuner Erkrankungen kontrollieren (66,67,106,198). In der Pathogenese von Hypogammaglobulinämien scheint der gesteigerten Suppressorzellaktivität eine ursächliche Bedeutung zuzukommen (172,197).

Bei den eigenen Untersuchungen mit Lymphozyten von Patienten mit akuter, unkompliziert verlaufender Hepatitis war die Suppressorzellaktivität normal oder sogar überdurchschnittlich hoch. Nur bei Patienten, bei denen ein verzögerter Verlauf zu beobachten war, (SGPT über 100 IU nach vier Krankheitswochen) ließ sich in der ersten Krankheitswoche eine vorübergehende Erniedrigung dieser Zellfunktion feststellen. Eine Korrelation der Suppressorzellaktivität zu laborchemischen, klinischen oder virologisch-serologischen Parametern ließ sich nicht finden. Diese Beobachtungen stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chisari et al. (32) Hodgson et al. (85) und Tremolada et al. (190) und lassen vermuten, daß ein ursächlicher Zusammenhang besteht zwischen der Funktion der Suppressorzellen und der monozytären Infiltration und Lyse von Hepatozyten (97) : Vor dem Auftreten des Ikterus scheint eine Aktivierung von zytotoxischen T- und natürlichen Killerzellen (69,129,163, 194,196,199) gegen membrangebundene Virus-, Auto- und Neoantigene (3,114,118,130,147,174,191,193) mit einem Verlust der suppressiven lymphozytären Aktivität assoziiert zu sein und zu einer Zerstörung von Leberzellen zu führen (94,116,144). Diese lytischen Reaktionen gegen Hepatozyten werden möglicherweise mit der Normalisierung oder sogar mit einem Überschießen der Aktivität von Suppressorzellen schon zum Zeitpunkt der höchsten entzündlichen Aktivität (SGPT-Maximum) beendet (68,101). Lediglich bei Patienten, bei denen die entzündlichen Erscheinungen in der Leber ungewöhnlich lang fortbestehen, kann eine reduzierte Suppressorzellaktivität noch nach dem Auftreten des Ikterus gemessen werden (32,85,94).

Patienten mit chronischer Hepatitis zeigten eine sehr unterschiedliche Ausprägung der Suppressorzellfunktion. Es konnte überdurchschnittlich starke Hemmung der Responderzellproliferation wie auch ein völliger Verlust der suppressiven Eigenschaften beobachtet werden.

Auch andere Autoren (32,85,144) haben festgestellt, daß diese Streuung unabhängig von biochemischen Parametern oder der histologischen Aktivität sowohl bei chronischen B- wie auch bei chronischen posttransfusionellen NANB-Hepatitiden vorhanden ist. Die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete reduzierte Suppressorzellaktivität bei Patienten mit chronischer Hepatitis ist kein Effekt von Steroiden, da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Patient unter Kortisontherapie stand (94,97).

Patienten mit autoimmuner, "lupoider" chronisch aktiver Hepatitis zeigten eine einheitliche, reduzierte Suppressorzellaktivität (37,190) im Gegensatz zu Patienten mit sporadisch auftretender chronischer NANB-Hepatitis, die durchweg normal supprimierten. Das häufige Auftreten von Autoantikörpern, Hypergammaglobulinämien und von klinischen Autoimmunphänomenen wie Hauterscheinungen kann möglicherweise durch eine reduzierte Suppressorzellaktivität im Sinne eines Verlustes der Selbsttoleranz erklärt werden (5,33,38,181).

Es gilt inzwischen als sicher, daß bei NZB W/B-Mäusehybriden mit spontan auftretenden Immunphänomenen der angeborene Mangel an Suppressorzellen für die Autoaggression verantwortlich ist (106). Zellklone, die normalerweise supprimiert sind, bzw. nur vorübergehend während Infektionen aktiv werden können, können bei diesen Tieren ungehemmt proliferieren und die Zerstörung körpereigener Strukturen herbeiführen. Bei anderen Mäusestämmen, die ebenfalls LE-ähnliche Krankheitsbilder entwickeln, scheinen noch verschiedene andere immunpathologische Mechanismen für die Autoaggression verantwortlich zu sein (178,185,186).

Es wird diskutiert, daß veränderte Immunreaktionen, mitbedingt durch eine Reduktion der Suppressorzellaktivität, bei Patienten mit Lupus erythematodes und nun auch bei Patienten mit chronischer autoimmuner Hepatitis eine pathogenetische Rolle spielen (25,54,55,100,147,183).

Bei der primär-biliären Zirrhose, bei der ebenfalls eine autoimmune Genese angenommen wird, wurde eine reduzierte Suppressorzellaktivität beschrieben (212). Da auch bei einzelnen Patienten mit chronischer B-Hepatitis Autoantikörper bei reduzierter Suppressorzellaktivität beobachtet wurden, könnte in diesen Fällen ein Mangel an Suppressor-T-Zell-Funktion für das chronische Geschehen verantwortlich sein (54,116). Mit Sicherheit ist jedoch das Ausbleiben der Normalisierung der Suppressorzellaktivität nur eine mögliche Ursache für den Übergang einer akuten in eine chronische Hepatitis (103,116).

In letzter Zeit wird der Funktion von Helferzellen bei der Aufrechterhaltung einer normalen Immunfunktion immer größere Bedeutung beigemessen (13,30,157,167). Ein Zusammenwirken von Helfer- und Suppressorzellen ist wahrscheinlich, wenn auch die exakte Funktion sowohl der Helfer- wie auch der Suppressorzellen noch weitgehend unklar ist (13,28,167). Bei der Entwicklung einer chronischen Hepatitis scheint die Funktion von Helferzellen jedoch nicht verändert zu sein (10,94,144).

Eine Kontrolle der klinischen und laborchemischen Parameter etwa ein Jahr nach der Untersuchung der lymphozytären Funktionen ergab - unabhängig von der Genese - eine günstigere Prognose für Patienten mit normaler Suppressorzellaktivität. Während das klinische Bild bei Patienten mit reduzierter Suppressorzellfunktion in keinem Fall gebessert, sondern meistens unverändert oder - zum Teil trotz immunsuppressiver Therapie - verschlechtert war, war bei allen Patienten mit normaler Suppressorzellaktivität eine Besserung der Befunde eingetreten. Für PHA- und NME-Stimulierbarkeit war eine prognostische Relevanz nicht festzustellen. Die Bestimmung der Suppressorzellaktivität könnte deshalb möglicherweise die Entscheidung über therapeutische Maßnahmen bei Patienten mit chronischer Hepatitis erleichtern (54).

Aufgrund klinischer Erfahrungen und im Hinblick auf die geringere Progredienz der HB_s-Antigen positiven chronischen Hepatitis scheint eine immunsuppressive Therapie bei viral bedingten chronischen Hepatitiden wenig sinnvoll (128,161,166). Bei diesen Patienten konnte vor kurzem eine vorübergehende Hemmung der viralen Replikation und der Transaminasenaktivität mit Adeninarbinosid (202,204) bzw. Interferon (73) erreicht werden. Bei Patienten mit chronischer HB_s-Antigen negativer Hepatitis ist eine günstige Beeinflussung des Krankheitsverlaufs durch Azathioprin und Steroide möglich (128,161). Wenn bei Patienten mit chronischer Hepatitis ein Defekt der Suppressorzellaktivität vorliegt, wie in den vorliegenden Untersuchungen bei chronischen Hepatitiden autoimmuner Genese festgestellt wurde, so scheint bei diesen Patienten eine immunsuppressive Therapie besonders angezeigt.

E Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurden für die Lymphozytenfunktionen Suppressorzellaktivität, Mitogenstimulierbarkeit (PHA) und Antigenreaktivität (NME) Testbedingungen erarbeitet, bei denen diese Parameter zuverlässig und genau untersucht werden können. Unter Standardbedingungen wurden individuelle und zeitliche Schwankungen dieser Lymphozytenfunktionen bei einem Normalkollektiv ermittelt, um mögliche Abweichungen der Patientengruppen sicher beurteilen zu können.

Bei Patienten mit akuter Hepatitis zeigte sich - unabhängig von der viralen Genese - eine vorübergehende Erniedrigung der Lymphozytenproliferation ein bis drei Wochen nach dem Auftreten des Ikterus. Die reduzierte Proliferationsfähigkeit ließ sich bei Verwendung des Antigens von Neurospora Crassa (NME) sensibler erfassen als bei polyklonaler Stimulation mit dem Mitogen PHA. Die con A induzierte Suppressorzellaktivität war bei akuter Hepatitis nur dann erniedrigt, wenn die Infektion verzögert ausheilte.

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis waren die Lymphozytenfunktionen Suppressorzellaktivität, Mitogenstimulierbarkeit und Antigenreaktivität sehr unterschiedlich ausgeprägt. In der Gruppe der autoimmunen chronischen Hepatitiden wurde allerdings eine deutlich reduzierte Suppressorzellaktivität beobachtet. Verlaufskontrollen der klinischen Befunde bei Patienten mit chronischer Hepatitis unterschiedlicher Genese ergaben eine günstigere Prognose für Patienten mit normaler Suppressorzellfunktion.

Die Ergebnisse zeigten, daß veränderte Lymphozytenfunktionen im Ablauf einer Hepatitisinfektion auftreten. Der Zusammenhang zwischen eingeschränkter Immunreaktion und dem Übergang in eine chronische Verlaufsform ist zu diskutieren. Patienten mit autoimmun bedingter chronischer Hepatitis lassen sich aufgrund der erniedrigten Suppressorzellaktivität von sporadisch auftretenden chronischen Hepatitiden abgrenzen. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen autoimmuner chronischer Hepatitiserkrankung und reduzierter Suppressorzellaktivität ist denkbar.

F Literaturverzeichnis

1. Abdou,N.I. , A.Sagawa , E.Pascual , J.Hebert , S.Sadeghee : Suppressor T-cell abnormality in idiopathic Systemic Lupus Erythematosus. Clin.Immunol.Immunopathol. 6 : 192-199 , 1976

2. Agarwal,S.S. , B.S.Blumberg , B.J.S.Gerstley , W.T.London , I.Millmann , A.J.Sutnick , L.A.Loeb : Lymphocyte transformation and hepatitis : I.Impairment of thymidine incorporation and DNA polymerase activity. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.137 : 1498-1502 , 1971

3. Alberti,A. , G.Realdi , F.Tremolada , P.Cadrobbi : HB-antigen on liver cell surface in viral hepatitis. Lancet I : 346 , 1975

4. Allan,J.E. , G.R.Shellam , J.E.Grundy : Effect of murine cytomegalovirus infection on mitogen responses in genetically resistant and susceptible mice. Infection and Immunity Vol.36,No.1 : 235-242 , 1982

5. Allison,A.C. : Mechanismus by which autoimmunity can be produced. Progress in Immunology II : 512-519 , 1977

6. Alter,H.J. , P.V.Holland , R.H.Purcell , J.J.Lander , S.M.Feinstone , A.G.Morrow , P.J.Schmidt : Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen-positive donnors. Ann.Intern.Med. 77 : 691-699 , 1972

7. Alter,H.J. , R.H.Purcell , P.V.Holland , S.M.Feinstone , A.G.Morrow , Y.Moritsugu : Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet II : 838-841 , 1975

8. Anderson,J. , O.S.Jöberg , G.Möller : Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. Transplant.Rev.11 : 131, 1972

9. Aurich,G. , H.-D.Göring , H.Kramer , Ch.Schütt , H.Schwenke : Empfehlung zu einer methodischen Standardisierung des Lymphozytentransformationstestes. Allergie und Immunol. 25 : 3-9 , 1979

10. Bach,M.A. , J.F.Bach : Imbalance in T-cell subsets in human diseases.
Int.J.Immunopharmac. Vol.3,No.3 : 269-273 , 1981

11. Banck,G. , A.Forsgren : Many bacterial species are mitogenic for human blood B lymphocytes.
Scand.J.Immunol.8 : 347-354 , 1978

12. Baron,M. , E.C.Keystone , D.D.Gladmann , P.Lee , L.Poplonski : Lymphocyte subpopulations and reactivity to mitogens in patients with scleroderma.
Clin.exp.Immunol. 46 : 70-76 , 1981

13. Basten,A. , R.H.Loblay , R.J.Trent , P.A.Gatenby : Suppressor T-cells in immune homeostasis and disease.
In: Recent advances in clinical immunology Ed. : R.A.Thompson , Churchill Livingstone : 33-63 , 1980

14. Berg,P.A. : Klinik und Immunologie der autoimmunen chronisch aktiven Hepatitis und der primär-biliären Zirrhose. Immun.Infekt. 10,1 : 3-14 , 1982

15. Berger,R. , G.Florent , M.Just : Decrease of the lymphoproliferative response to varicella-zoster virus antigen in the aged.
Infection and Immunity 32,1 : 24-27 , 1981

16. Bernhard,M.I. , R.C.Pace , S.W.Unger , H.J.Wanebo : The influence of incubation time and mitogen concentration on lymphocyte blastogenic response. J.Immunol. 124 : 964-968 , 1980

17. Bernheim,J.L. , J.Mendelsohn : DNA-synthesis and proliferation of human lymphocytes in vitro : Characterization of the DNA newly synthesized after PHA-stimulation. J.Immunol.120 : 963-970 , 1978

18. Biozzi,G. , D.Mouton , O.A.Sant'Anna , H.C.Passos , M.Gennari . M.H.Reis . V.C.A.Ferreira , A.M.Heumann , Y.Bouthillier , O.M.Ibanez , C.Stiffel , M.Siqueira : Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr.Topics Microbiol.Immunol.85 : 31-98 , 1979

19. Blumberg,B.S. , H.J.Alter , S.J.Visnich : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 101-106 , 1965

20. Bøyum,A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand.J.Clin.Lab.Invest.21(suppl.97) : 77-89 , 1968

21. Borkowsky,W. , F.T.Valentine : The proliferative response of human lymphocytes to antigen is suppressed preferentially by lymphocytes precultured with the same antigen. J.Immunol.122 : 1867-1873 , 1979

22. Boyer,J.L. , G.Klatskin : Pattern of necrosis in acute viral hepatitis: prognostic value of bridging. N.Engl.J.Med:283 : 1063-1071 , 1970

23. Bradley,D.W. , E.H.Cook , J.E.Maynard , K.A.McCaustland , J.W.Ebert , G.H.Dolana , R.A.Petzel , R.J.Kantor , A.Heilbrunn , H.A.Fields , B.L.Murphy : Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: Recovery of virus-like particles associated with NANB hepatitis : J.Med.Virol.3 : 253-269 , 1979

24. Brattig,N. , P.A.Berg : Serum inhibitory factors (SIF) in patients with acute and chronic hepatitis and their clinical significance.
Clin.exp.Immunol.25 : 40-49 , 1976

25. Bresnihan,B. , H.E.Jasin : Suppressor function of PBMC in normal individuals and in patients with SLE.
J.Clin.Invest.59 : 106-116 , 1977

26. Broder,S. , R.Humphrey , M.Durm , M.Blackman , B.Meade , C.Goldman , W.Strober , T.Waldmann : Impaired synthesis of polyclonal immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma. Role of suppressor cells. N.Engl.J.Med.293 : 887-892 , 1975

27. Brown,J. : A micro-method for the study of in vitro lymphocyte transformation to specific antigens.
J.Immunol.Methods 18 : 17-32 , 1977

28. Cantor,H. : Regulation of immune responses: Analysis with lymphocyte clones. Cell 25 : 7-8 , 1981

29. Cantor,H. , L.McVay-Boudreau , J.Hugenberger , K.Naidorf , F.W.Shen , R.K.Gershon : Immunoregulatory circuits among T-cell sets. II Physiologicrole of feed-back inhibition in vivo : absence in NZB mice.
J.Exp.Med.147 : 1116-1125 , 1978

30. Cantor,H. , F.W.Shen , E.A.Boyse : Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II Activation by antigen : after immuniza-tion, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses.
J.Exp.Med.143 : 1391-1401 , 1976

31. Chisari,F.V. , J.A.Routenberg , D.A.Anderson , T.S.Edgington : Cellular immune reacivity in HBV-induced liver desease. In: Viral hepatitis, Eds: G.N. Vyas , S.N.Cohen , R.Schmid , The Franklin Institute Press, Philadelphia : 245-266 , 1978

32. Chisari,F.V. , K.L.Castle , C.Xavier , D.S.Anderson : Functional properties of lymphocyte subpopulations in hepatitis B virus infection. I. Suppressor cell control of T lymphocyte responsiveness. J.Immunol.126 : 38-44 , 1981

33. Clamann,H.N. , S.D.Miller , M.S.Sy : Suppressor cells in tolerance to contact sensitivity active against hapten-syngeneic and hapten-allogeneic determinants. J.Exp.Med.146 : 49-58 , 1977

34. Closs,O. , L.J.Reitan , K.Negassi , M.Harboe , A.Belehu : In vitro stimulation of lymphocytes in leprosy patients, healthy contacts of leprosy patients, and subjects not exposed to leprosy. Scand.J.Immunol.16 : 103-115 , 1982

35. Cole,P.J. , M.E.Molyneux : Lymphocyte reactivity to influenza virus in man. Immunol.29 : 749-754 , 1975

36. Cooper,M.D. : Mechanisms of autoimmune phenomena and immune deficiencies. In : Immunology 80 . Eds : M.Fourgereau , J.Dausset . Academic Press,London : 996-998 , 1980

37. Coovadia,H.M. , I.R.Mackay , A.J.D'Apice : Suppressor cells assayed by three different methods in patients with chronic active hepatitis and systemic lupus erythematosus. Clin.Immunol.Immunopathol.18 : 268-275 , 1981

38. Cunningham,A.J. : Self-tolerance maintained by active suppressor mechanisms. Transplant.Rev.31 : 23-43 , 1976

39. Cunningham-Rundles,S. , C.Cunningham-Rundles , D.I.Ma , F.P.Siegal , S.Gupta . E.M.Smithwick , C.Kosloff , R.A. Good : Impaired proliferative response to B-lymphocyte activators in common variable immunodeficiency. Scand.J.Immunol.15 : 279-286 , 1982

40. Dane,D.S. , C.H.Cameron , M.Briggs : Virus-like particles in serum of patients with Australia-Antigen-associated hepatitis. Lancet I : 695-698 , 1970

41. Davie,J.M. , A.S.Rosenthal , W.E.Paul : Receptors on immunocompetent cells. J.Exp.Med.134 : 517 , 1971

42. DeGast,G.C. , B.Houwen , H.O.Nieweg : Specific lymphocyte stimulation by purified, heat inactivated hepatitis-B antigen. Br.Med.J.4 : 707-709 , 1973

43. DeGroote,J. , V.J.Desmet , P.Gedigk , G.Korb , H.Popper , H.Poulsen , P.J.Scheuer , M.Schmid , H.Thaler , E.Uehlinger , W.Wepler : A classification of chronic hepatitis. Lancet II : 626-628 , 1968

44. Dienstag,J.L. , A.Alaama , J.W.Mosley , A.G.Redeker , R.H.Purcell : Etiology of sporadic HB_s-Ag negative hepatitis. Ann.Intern.Med.87 : 1-6 , 1977

45. Dienstag, J.L. , W.Szmuness , C.E.Stevens , R.H.Purcell : Hepatitis A virus infection : New insights from seroepidemiologic studies. J.Infect.Dis.137 : 328-340 , 1978

46. Dmochowski,L. : Viral type A and type B hepatitis : Morphology, biology, immunology and epidemiology - a review. Am.J.Clin.Pathol.65 : 741-786 , 1976

47. Dobloug,J.H. , C.Chattopadhyay , Ø.Førre . H.M.Høyeraal , J.B.Natvig : Con A-induced SC activity and T-lymphocyte subpopulations in PBL of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. Scand.J.Immunol.13 : 367-373 , 1981

48. Dudley,F.J. , V.Giustino , S.Sherlock : Cell mediated immunity in patients positive for hepatitis-associated antigen. Br.Med.J.4 : 754-756 , 1972

49. Dudley,F.J. , R.A.Fox , S.Sherlock : Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. Lancet I : 723-726 , 1972

50. Dudley,F.J. , P.J.Scheuer , S.Sherlock : Natural history of hepatitis-associated antigen-positive chronic liver disease. Lancet II : 1388-1393 , 1972

51. Dudley,F.J. , M.J.O'Shea , A.Ajdukiewicz , S.Sherlock : Serum autoantibodies and immunoglobulins in hepatitis-associated antigen (HAA)-positive and negative liver disease. Gut 14 : 360-364 , 1973

52. Dwyer,J.W. , K.R.Mackay : Validation autoradiography for recognition of antigen binding lymphocytes in blood and lymphoid tissue : Quantitation and specificy of binding. Clin.Exp.Med.10 : 581 , 1972

53. Dwyer,J.M. , J.P.Gregg , F.S.Kantor : Cellular and humoral immune responses to prolonged desensitization. Fed. Proc.32 : 1022 , 1973

54. Eddleston,A.L.W.F. , R.Williams : Inadequate antibody response to HB-Ag or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. Lancet II : 1543-1545 , 1974

55. Eggink,H.F. , H.J.Houthoff , S.Huitema, C.H.Gips, S.Poppema : Cellular and humoral immune reactions in chronic liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic auto-immune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. Clin.exp.Immunol.50 : 17-24 , 1982

56. Ellner,J.J. , G.R.Olds , G.S.Osman , A.Kholy , A.A.F. Mahmoud : Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. J.Immunol.126 : 309-312 , 1981

57. Eskola,J. , H.Frey , G.Molnár , E.Soppi : Biological rhythm of cell mediated immunity in man. Clin.exp.Immunol.26 : 253-257 , 1976

58. Evans,R.L. , H.Lazarus , A.C.Penta , S.F.Schlossmann : Two functionally distinct subpopulations of human T-cells that collaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell-mediated lympholysis. J.Immunol.120 : 1423-1428 , 1978

59. Farrow,J.L. , J.S.Stewart , H.Stern , R.E.Clifford , H.G. Smith , A.J.Zuckermann : nonA,nonB Hepatitis in West London. Lancet I : 982-984 , 1981

60. Feighery,C. , J.F.Greally , D.G.Weir : Mitogen responsiveness in viral hepatitis and chronic active hepatitis: The role of reversible suppressive influences. Gut 21 : 738-744 , 1980

61. Feinmann,S.V. , B.Berris , N.Cooter , J.C.Sinclair , D.M.Wrobel : Results of a long-term prospective study of the hepatitis B surface antigen (HB_sAg) carrier state. Hepato-Gastroenterol.29 : 58-61 , 1982

62. Feinstone,S.M. , A.Z.Kapikian , R.H.Purcell : Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science 182 : 1026-1028 , 1973

63. Fiorilli,M. , M.C.Sirianni , P.Iannetti , A.Pana , M.Divizia , F.Aiuti : Cell mediated immunity in human Cytomegalovirus infection. Infect.Immun.35 : 1162-1164 , 1982

64. Gerber,P. , S.J.Lucas : In vitro stimulation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. Cell.Immunol.5 : 318-324 , 1974

65. Germain,R.N. , B.Benacerraf : Hypothesis : A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen specific immune suppression. Scand.J.Immunol.13 : 1-10 , 1981

66. Gershon,R.K. : Immune regulation. Fed.Proc.38 : 2051-2077 , 1979

67. Gershon,R.K. : Suppressor T cells : A miniposition paper celebrating a new decade. In : Immunol.80 , Eds : M.Fougereau,J.Dausset , Academic Press : 376-388 , 1980

68. Gocke,D.J. , A.M.Ackley , H.C.Kim , G.D.Benson : Alterations in helper and suppressor T lymphocytes in hepatitis. Hepatol.1 : 511 , 1981

69. Gonzales,C. , A.M.G.Cochrane , A.L.W.F.Eddleston , R.Williams : Mechanisms responsible for antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Gut 20 : 385-388 , 1979

70. Goodwin,J.S. , R.P.Searles , K.S.K.Tung : Immunological responses of a healthy elderly population. Clin.exp.Immunol.48 : 403-410 , 1982

71. Goodwin,J.S. : Prostaglandin regulation of mitogenesis. (letter) Cell.Immunol.52 : 239-240 , 1980

72. Gordon,I.L. , P.H.Coluzzi , J.J.Favero , J.W.Parker , R.L.O'Brien : Lymphocyte receptors for polyclonal T mitogens : I. Con A binding to lymphocytes inhibits mitogenesis induced by Galactose Oxidase. Cell.Immunol.68 : 25-37 , 1982

73. Greenberg,H.B. , R.B.Pollard , L.I.Lutwick , P.B.Gregory , W.S.Robinson , T.C.Merigan : Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. N.Engl.J.Med.295 : 517-522 , 1976

74. Gupta,S. , R.A.Good : Subpopulations of human T lymphocytes : Laboratory and clinical studies. Immunol.Rev.56 : 89-114 , 1981

75. Gupta,S. , S.A.Schwartz , R.A.Good : Subpopulations of human T lymphocytes VII : Cellular basis of con A-induced T-cell-mediated suppression of immunoglobulin production by B lymphocytes from normal donors. Cell.Immunol.44 : 242-251 , 1979

76. Hadziyannis,S. , C.Vissoulis , A.Moussourus , A.Afroudakis : Cytoplasmatic localization of Australia antigen in the liver. Lancet I : 976-979 , 1972

77. Hallgren,H.M. , E.J.Yunis : Suppressor lymphocytes in young and aged humans. J.Immunol.118 : 2004-2008 , 1977

78. Han.T. , B.Dadey : T-lymphocyte dependency of B-lymphocyte blastogenic response to phytomitogens. Immunol.34 : 625-629 , 1978

79. Haneberg,B. , F.Wesenberg , D.Aarskog : Lymphocyte multiplication in vitro induced by mitogens and antigens. Scand.J.Immunol.8 : 9-13 , 1978

80. Hantz,O. , L.Vitvitski , C.Trepo : NANB-hepatitis : Identification of hepatitis-B-like virus particles in serum and liver. J.Med.Virol.5 : 73-86 , 1980

81. Haynes,B.F. , P.Katz , A.S.Fauci : Immune responses of human lymphocytes in vitro. Prog.Clin.Immunol.4 : 23-63 , 1980

82. Hefton,J.M. , G.J.Darlington , B.A.Casazza , M.E.Weksler : Immunologic studies of aging : Impaired proliferation of PHA responsive human lymphocytes in culture. J.Immunol.125 : 1007-1010 , 1980

83. Herscowitz,H.B. , T.Sakane , A.D.Steinberg , I.Green : Heterogeneity of human SC induced by con A as determined in simultaneous assays of immune function. J.Immunol.124 : 1403-1410 , 1980

84. Hirsch,M.S. , M.R.Proffitt : autoimmunity in viral infections. In : Viral immunology and immunopathology Ed : A.L.Notkins, Academic Press, New York : 419-434 , 1975

85. Hodgson,H.J.F. , J.R.Wands , K.J.Isselbacher : Alteration in SC activity in chronic aktive hepatitis. Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 75 : 1549-1553 , 1978

86. Horwitz,D.A. , M.A.Garrett : Lymphocyte reactivity to mitogens in subjects with SLE, rheumatoid arthritis and scleroderma. Clin.exp.Immunol.27 : 92-99 , 1977

87. Hug,G. , Genetic factors and autoimmunity in viral hepatitis. Am.J.Clin.Pathol.65 : 870-875 , 1976

88. Hunninghake,G.W. , A.S.Fauci : Lymphocyte mediated cytotoxicity against human allogeneic and autologous lymphoid targets after con A activation of cytotoxic effector cells. J.Immunol.119 : 1122-1128 , 1977

89. Ilonen,J. : Lymphocyte blast transformation response of seropositive and seronegative subjects to herpes simplex, rubella, mumps and measles virus antigens. Acta path.microbiol.scand.Sect.C 87 : 151-157 , 1979

90. Ishak,K.G. : Light microscopic morphology of viral hepatitis. Am.J.Clin.Pathol.65 : 787-827 , 1976

91. Iwarson,S. , J.Lindberg , P.Lundin : Progression of hepatitis NANB to chronic active hepatitis: A histological follow-up of two cases. J.clin.Pathol.32 : 351-355 , 1979

92. Kabiri,M. , E.Tabor , R.J.Gerety : Antigen-antibody system associated with NANB detected hepatitis by indirect immunofluorescence.
Lancet II : 221-224 , 1979

93. Kaboth,U. , O.Klinge , A.Schober , K.Winckler : Bioptische Verlaufsuntersuchungen der Leber über 4-5 Jahre bei klinisch gesunden HB_s-Ag-Trägern.
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med.82 : 394-396 , 1976

94. Kakumu,S. , K.Yata , T.Kashio : Immunoregulatory T-cell function in acute and chronic liver disease.
Gastroenterology 79 : 613-619 , 1980

95. Kantor,F.S. , C.B.Hall , E.A.Lipsmeyer : Regulatory mechanisms in delayed hypersensitivity, cellular interactions in the immune response.
In : 2nd international convocation on Immunology, New York. Eds : S.Cohen , G.Cudkowicz , R.T.McCluskey , S.Karger, Basel : 213-218 , 1971

96. Kantor,F.S. : Infection, Anergy and cell mediated immunitiy. N.Engl.J.Med.292 : 629-634 , 1975

97. Kashio,T. , R.Hotta , S.Kakumu : Lymphocyte SC activity in acute and chronic liver disease.
Clin.exp.Immunol.44 : 459-466 , 1981

98. Kauffman,C.A. , A.G.Bergmann , R.P.O'Connor : Distemper virus infection in ferrets: An animal model of measles-induced immunosuppression.
Clin.exp.Immunol.47 : 617-625 , 1982

99. Klein,E. , M.G.Masucci : Cell-mediated immunity against Epstein-Barr virus infected B lymphocytes. Springer Semin. Immunopathol.5 : 63-73 , 1982

100. Klingenstein,R.J. , J.R.Wands : Immunologic effector mechanisms in hepatitis B-negative chronic active hepatitis. Springer Sem.Immunopathol.3 : 317-329 , 1980

101. Klingenstein,R.J. , A.M.Savarese , J.L.Dienstag, R.H. Rubin , A.K.Bhan : Immunoregulatory T cell subsets in acute and chronic hepatitis.
Hepatology 1 : 523 , 1981

102. Knodell,R.G. , M.E.Conrad , K.G.Ishak : Development of chronic liver disease after acute NANB posttransfusion hepatitis. Gastroenterology 72 : 902-909 , 1977

103. Koff,R.S. : Biology and immunopathogenesis of infection with hepatitis viruses and immune complexes in viral hepatitis. In : Viral hepatitis Eds : J.Willy and sons, New York: 43-55 , 1977

104. Koretz,R.L. , D.Klahs , S.Ritman , K.H.Damus , G.L. Gitnick : Post-transfusion hepatitis in recipients of blood screened by newer assays.
Lancet II : 694-696 , 1973

105. Koretz,R.L. , S.C.Suffin , G.L.Gitnick : Post-transfusion chronic liver disease. Gastroenterology 71 : 797-803 , 1976

106. Krakauer,R.S. , W.Strober , T.A.Waldmann : Loss of suppressor T-cells in the pathogenesis of the autoimmunity of NZB/W mice. Arthritis and Rheumatism Vol.21,5 (suppl.) : 185-189 , 1978

107. Kremastinou,T. , C.R.Howard , J.Skelly , A.J.Zuckerman : Induction of cell-mediated immunity to HB_s-Ag polypeptides. Intervirology 16 : 176-183 , 1981

108. Krugman,S. , R.Ward , J.P.Giles : The natural history of infectious hepatitis. Am.J.Med.32 : 717-728 , 1962

109. Krugman,S. , J.P.Giles , J.Hammond : Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. JAMA.200 : 365-373 , 1967

110. Kunkel,H.G. , E.H.Ahrens , W.J.Eisenminger , A.M. Bongiovanni , R.J.Slater : Extreme hypergammaglobulinemia in young women with liver disease of unknown etiology. J.Clin.Invest.30 : 654 , 1951

111. Lammert,J.K. , P.B.Wyrick : Modulation of the host immune response as a result of Chlamydia psittaci infection. Infection and Immunity 35 : 537-545 , 1982

112. Lee,W.M. , W.D.Reed , C.G.Mitchell , R.M.Galbraith , A.L.W.F.Eddleston , A.J.Zuckerman , R.Williams : Cellular and humoral immunity to HB_s-Ag in chronic active hepatitis. Br.Med.J.1 : 705-708 , 1975

113. Lee,W.M. , W.D.Reed , C.G.Mitchell , I.L.Woolf , I.W. Dymock , A.L.W.F.Eddlestone , R.Williams : Cell mediated immunity to HB_s-Ag in blood donors with persistent antigenaemia. Gut 16 : 416-420 , 1975

114. Lee,W.M. , W.D.Reed , C.G.Osman , J.Vahrman , A.J. Zuckerman , A.L.W.F.Eddleston , R.Williams : Immune response to the HB_s-Ag and liver specific lipoprotein in acute type B hepatitis. Gut 18 : 250-257 , 1977

115. Lehmann-Grube,F. , J.Cihak , M.Varho , R.Tijerina : The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. II. Active suppression of cell mediated immunity by infection with high virus doses. J.Gen.Virol.58 : 223-235 , 1982

116. Levy,G.A. , F.V.Chisari : The immunopathogenesis of chronic HBV induced liver disease. Springer Semin. Immunopathol.3 : 439-459 , 1981

117. Loh,L. , J.B.Hudson : Murine Cytomegalovirus-induced immunosuppression. Infect.Immun.36 : 89-95 , 1982

118. Lutwick,L.I. , M.B.Hebert . T.Sklamberg : Specifity of hepatitis B virus affinity for human hepatic tissue. J.Med.Virol.9 : 101-109 , 1982

119. MacDonald,S.M. , A.H.Goldstone , J.E.Morris , A.N.Exton-Smith , R.E.Callard : Immunological parameters in the aged and in Alzheimer's disease. Clin.exp.Immunol.49 : 123-128 , 1982

120. Mackay,I.R. , L.I.Taft , D.C.Cowling : Lupoid hepatitis. Lancet II : 1323-1326 , 1956

121. MacLachlan,M.J. , G.P.Rodnan , W.M.Cooper , R.H.Fennell : chronic active (lupoid) hepatitis : A clinical, serological and pathological study of 20 patients. Ann.Intern.Med.62 : 425-462 , 1965

122. Madsen,M. , H.E.Johnsen , F.Kissmeyer-Nielsen : Separation of human T and B lymphocytes using AET treated sheep red blood cells. Transplant.Proc.11 : 1381-1382 , 1979

123. Malave,I. , Z.Layrisse , M.Layrisse : Dose dependent hyporeactivity to PHA in SLE. Cell.Immunol.15 : 231-236 , 1975

124. McFarland,H.F. , C.A.Pedone , E.S.Mingioli , D.E. McFarlin : The response of human lymphocyte subpopulations to measles, mumps and vaccinia viral antigens. J.Immunol.125 : 221-225 , 1980

125. McIntyre,O.R. , A.F.Cole : Variation in the response of normal lymphocytes to PHA. Int.Arch.Allergy 35: 105-118 , 1969

126. Mascart-Lemone,F. , G.Delespesse , G.Servais , M.Kunstler : Characterization of immunoregulatory T lymphocytes during ageing by monoclonal antibodies. Clin.exp.Immunol.48 : 148-154 , 1982

127. Mathiesen,L.R. , F.Hardt , O.Dietrichson , R.H.Purcell , D.Wong , P.Skinhøj , J.O.Nielsen , H.Zoffmann , K. Iversen : The role of acute heaptitis type A, B and NANB in the development of chronic active liver disease. Scand.J.Gastroenterol. 15 : 49-54 , 1980

128. Meyer zum Büschenfelde,K.H. (Koordinator der PEG-Studie) : Immunsuppressive Therapie der HB_s-Antigen positiven und negativen chronisch aktiven Hepatitis. (Ergebnisse einer kontrollierten Studie) Dtsch.Med.Wochenschr.21 : 887-892 , 1978

129. Mieli-Vergani,G. , D.Vergani , P.J.Jenkins , B.Portmann , A.P.Mowat , A.L.W.F.Eddleston , R.Williams : Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HB_s-Ag negative chronic active hepatitis. Clin.exp.Immunol.38 : 16-21 , 1979

130. Miller,J. , M.G.M.Smith , C.G.Mitchell , W.D.Reed , A.L.W.F.Eddleston , R.Williams : Cell mediated immunity to a human liver specific antigen in patients with active chronic hepatitis and PBC. Lancet II : 296-297 , 1972

131. Mitchell,G.F. : Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. Advances in immunology 28 : 451-511 , 1979

132. Møller-Larsen,A. , H.K.Andersen , J.Heron , J.Sarov : In vitro stimulation of human lymphocytes by purified Cytomegalovirus. Intervirology 6 : 249-257 , 1976

133. Moretta,L. , M.C.Mingari , A.Moretta , M.D.Cooper : Human T-lymphocyte subpopulations: Studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for Ig-G suppress T-dependent B cell differentiation induced by PWM. J.Immunol.122 : 984-990 , 1979

134. Mori,Y. , S.Ogata , S.Ata , Y.Nakano : Virus-like particles associated with NANB hepatitis. Microbiol.Immunol.24 : 1127-1130 , 1980

135. Morimoto,C. : Loss of suppressor T lymphocyte function in patients with SLE. Clin.exp.Immunol.32 : 125-133 , 1978

136. Mosley,J.W. , A.G.Redeker , S.M.Feinstone , R.H. Purcell : Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. N.Engl.J.Med.296 : 75-78 , 1977

137. Mosley,J.W. : Epidemiology of HAV infection In : Viral hepatitis , Eds: G.N.Vyas , S.N.Cohen , R.Schmid , The Franklin Institute Press, Philadelphia : 85-105 , 1978

138. Nakao,M. , Y.Mizoguchi , T.Monna , S.Yamamoto , S.Morisawa : Studies on an inhibitory factor to PHA-induced lymphocyte transformation found in the serum of patients with various liver diseases. Acta Hepato-Gastroenterol.25 : 335-343 , 1978

139. Newberry,W.M. , J.W.Shorey , J.P.Sanford , B.Combes : Depression of lymphocyte reactivity to PHA by serum from patients with liver disease. Cell.Immunol.6 : 87-97 , 1973

140. Newble,D.I. , K.T.Holmes , A.G.Wangel , I.J.Forbes : Immune reactions in acute viral hepatitis. Clin.exp.Immunol.20 : 17-28 , 1975

141. Nielsen,J.O. , O.Dietrichson , P.Elling , P.Christoffersen : Incidence and meaning of persistence of Australia antigen in patients with acute viral hepatitis: development of chronic hepatitis. N.Engl.J.Med.285 : 1157-1160 , 1971

142. Nielsen,J.O. , V.Reinicke , O.Dietrichson , V.Andersen , M.Thomsen , E.Andersen : Immunological studies of Australia antigen carriers with and without liver disease. Clin.exp.Immunol.15 : 9-16 , 1973

143. Ng,M.H. , W.S.Ng , T.K.Siu : Receptor-mediated regulation of mitogenic response. Clin.exp.Immunol.48 : 171-178 , 1982

144. Nonomura,A. , M.Tanino , H.Kurumaya , G.Ohta , Y.Kato , K.Kobayashi : Disordered immunoregulatory functions in patients with chronic active hepatitis. Clin.exp.Immunol.47 : 595-605 , 1982

145. Osa,S.R. , M.E.Weksler : Demonstration of significant differences in the proliferative capacity of lymphocytes from normal human subjects. Cell.Immunol.32 : 391-399 1977

146. Ottesen,E.A. , R.A.Hiatt , A.W.Cheever , Z.R.Sotomayor , F.A.Neva : The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man.
Clin.exp.Immunol.33 : 38-47 , 1978

147. Paronetto,F. , H.Popper : Two immunologic reactions in the pathogenesis of hepatitis? N.Engl.J.Med.294 : 606-607 , 1976

148. Petrini,B. , R.Möllby : Activation of human lymphocytes in vitro by membrane-damaging toxins from staphylococcus aureus. Infect.Immun.31 : 952-956 , 1981

149. Piccinino,F. , G.Manzillo , E.Sagnelli , G.G.Balestrieri , G.Maio , G.Pasquale , F.M.Felaco : The significance of the Australia antigen (HB_s-Ag) persistent healthy carrier "status" : A long-term follow-up study of 34 cases. Acta Hepato-Gastroenterol.25 : 171-178 , 1978

150. Piccolella,E. , G.Lombardi , R.Morelli : Human lymphocyte-activating properties of a purified polysaccharide from candida albicans: B and T cell cooperation in the mitogenic response.
J.Immunol.125 : 2082-2088 , 1980

151. Plaeger-Marshall,S. , J.W.Smith : Inhibition of mitogen- and antigen-induced lymphocyte blastogenesis by herpes simplex virus.
J.Infect.Dis.138 : 506-511 , 1978

152. Prince,A.M. : Role of serum hepatitis virus in chronic liver disease. Gastroenterology 60 : 913-921 , 1971

153. Rakela,J. , A.G.Redeker : Chronic liver disease after acute NANB viral hepatitis. Gastroenterology 77 : 1200-1202 , 1979

154. Rao,K.M.K. , S.A.Schwartz , R.A.Good : Modulation of the mitogenic response of lymphocytes from young and aged individuals by Prostaglandins and Indomethacin. Cell.Immunol.48 : 155-165 , 1979

155. Rao,K.M.K. , S.A.Schwartz : Reply to Dr.Goodwin (letter) Cell.Immunol.52 : 241 , 1980

156. Rasmussen,L.E. , G.W.Jordan , D.A.Stevens , T.C.Merigan : Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infections in humans. J.Immunol.112 : 728-736 , 1974

157. Reinherz,E.L. , S.F.Schlossman : Regulation of the immune response-inducer and suppressor T lymphocytes subsets in human beings. N.Engl.J.Med.303 : 370-373 , 1980

158. Roberts,N.J. : Variability of results of lymphocyte transformation assays in normal human volunteers. Responses of mononuclear leukocytes to mitogen stimulation. Am.J.Clin.Pathol.73 : 160-164 , 1980

159. Russel,A.S. , R.N.Maini , M.C.Bailey , D.C.Dumonde : Cell-mediated immunity to varicella-antigen in man. Clin.exp.Immunol.14 : 181-185 , 1972

160. Sagawa,A. , N.I.Abdou : Suppressor cell dysfunction in SLE. J.Clin.Invest.62 : 789-796 , 1978

161. Schalm,S.W. , W.H.J.Summerskill , G.L.Gitnick , L.R. Elveback : Contrasting features and responses to treatment of severe chronic active liver disease with and without HB_s-Ag. Gut 17 : 781-786 , 1976

162. Schimpl,A. , L.Hübner , C.Wong , E.Wecker : Nonantigen-specific T cell factors. Immunol.80 : 403-412 , 1980

163. Schindler,L. , H.Engler , H.Kirchner : Activation of natural killer cells and induction of Interferon after injection of mouse hepatitis virus type 3 in mice. Infect.Immun.35 : 869-873 , 1982

164. Schwartz,S.A. , L.Shou , R.A.Good , Y.S.Choi : Suppression of immunoglobulin synthesis and sectretion by peripheral blood lymphocytes from normal donors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74 : 2099-2103 , 1977

165. Scibienski,R.J. , L.M.Harris , S.Fong , E.Benjamini : Active and inactive states of immunologic unresponsiveness. J.Immunol.113 : 45-50 , 1974

166. Sherlock,S. : Chronic hepatitis. Gut 15 : 581-597 , 1974

167. Shimamura,T. , K.Hashimoto , S.Sasaki : Feedback suppression of the immune response in vivo. I. Immune B cells induce antigen-specific suppressor T cells. Cell.Immunol.68 : 104-113, 1982

168. Shimizu,Y.K. , S.M.Feinstone , R.H.Purcell , H.J.Alter , W.T.London : NANB hepatitis: Ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. Science 205 : 197-200 , 1979

169. Shirachi,R. , H.Shiraishi , A.Tateda , K.Kikuchi , N.Ishida : Hepatitis "C" antigen in NANB post-transfusion hepatitis. Lancet II : 853-856 , 1978

170. Shou,L. , S.A.Schwartz , R.A.Good : Suppressor cell activity after con A treatment of lymphocytes from normal donors. J.Exp.Med.143 : 1100-1110 , 1977

171. Siegal,F.P. , M.Siegal , R.A.Good : Suppression of B-cell differentiation by leucocytes from hypogammaglobulinemic patients.
J.Clin.Invest.58 : 109-122 , 1976

172. Siegal,F.P. , M.Siegal , R.A.Good : Role of helper, suppressor and B cell defects in the pathogenesis of the hypogammaglobulinemias.
N.Engl.J.Med.299 : 172-178 , 1978

173. Smith,K.A. , L.Chess , M.R.Mardiney : The relationship between rubella haemagglutination inhibition antibody and rubella induced in vitro lymphocyte tritiated thymidine incorporation.
Cell.Immunol.8 : 321-327 , 1973

174. Smith,M.G.M. , A.L.W.F.Eddleston , R.Williams : Immunological factors in the evolution of chronic active hepatitis and other autoimmune liver diseases.
Clin.Gastroenterol.4 : 297 , 1975

175. Sodomann,C.P. , M.Rother , K.Havemann , G.A.Martini : Lymphocyte proliferation to PHA in hepatitis B-antigen - positive and negative hepatitis. Res.Exp.Med.175 : 95-107 , 1979

176. Sörén,L. : Suppressor cells induced by purified protein derivative of tuberculin (PPD): the suppression is mediated by cells that proliferate in response to stimulation with PPD. Scand.J.Immunol.10 : 171-178 , 1979

177. Stanciu,L. , D.Cirstina , N.Parau , D.Radu , D.Dejica , V.Gorgan , S.Urcan : Cellular and humoral immune manifestations in acute viral hepatitis.
Hepato-Gastroenterol.29 : 66 , 1982

178. Steinberg,A.D. , D.P.Huston , J.D.Taurog , J.S.Cowdery , E.S.Raveche : The cellular and genetic basis of murine lupus. Immunol.Rev.55 : 121-154 , 1981

179. Sredni,B. , R.H.Schwartz : Antigen-specific, proliferating T lymphocyte clones. Methodology, specificity, MHC restriction and alloreactivity.
Immunol.Rev.54 : 187-223 , 1981

180. Suciu-Foca,N. , J.Buda , J.McManus , T.Thiem , K.Reemtsma : Impaired responsiveness of lymphocytes and serum-inhibitory factors in patients with cancer.
Cancer Res.33 : 2372-2377 , 1973

181. Sugiura,K. , Y.Hasumura , J.Takeuchi , J.Yata : Relationship between lymphocyte SC-activity on immunoglobulin production and presence of autoantibodies in patients with chronic liver disease.
Acta hepatoligica Japonica 21 : 1316-1321 , 1980

182. Tabor,E. , F.D.Mitchell , A.M.Goudeau , R.J.Gerety : Detection of an antigen-antibody system in serum associated with human NANB-hepatitis.
J.Med.Virol.4 : 161-169 , 1979

183. Talal,N. , J.R.Roubinian , H.Shear , J.T.Hom , N.Miyasaka : Progress in the mechanisms of autoimmune disease. In : Immunology 80 Eds : M.Fourgeau , J.Dausset , Academic Press, London : 889-905 , 1980

184. Tan,C.T.C. , M.de Sousa , R.Tan , J.A.Hansen , R.A. Good : In vitro responses of peripheral blood and spleen lymphoid cells to mitogens and antigens in childhood Hodgkin's disease.
Cancer Res.38 : 886-893 , 1978

185. Theofilopoulos,A.N. , R.A.Eisenberg , M.Bourdon , J.S. Crowell , F.J.Dixon : Distribution of lymphocytes identified by surface markers in murine strains with systemic lupus erythematosus-like syndromes.
J.Exp.Med.149 : 516-534 , 1979

186. Theofilopoulos,A.N. , F.J.Dixon : Etiopathogenesis of murine SLE. Immunol.Rev.55 : 179-216 , 1981

187. Thestrup-Pedersen,K. , K.Ladefoged , P.Andersen : Lymphocyte transformation test with liver-specific protein and PHA in patients with liver disease. Clin.exp.Immunol.24 : 1-8 , 1976

188. Thomas,H.C. : Cellular immunity to the hepatitis B virus. In: Virus and the Liver. Eds : L.Bianchi , W.Gerok , K.Sickinger , G.A.Stadler , MTP Press, Lancester : 161-168 , 1980

189. Tong,M.J. , A.M.Wallace , R.L.Peters , T.B.Reynolds : lymphocyte stimulation in hepatitis B infections. N.Engl.J.Med.283 : 318-322 , 1975

190. Tremolada,F. , G.Fattovich , G.Panebianco , G.Ongaro , G.Realdi : SC-activity in viral and non-viral caH. Clin.exp.Immunol.40 : 89-95 , 1980

191. Trump,B.F. , K.M.Kim , O.A.Iseri : Cellular pathophysiology of hepatitis. Am.J.Clin.Pathol.65 : 828-847 , 1976

192. Tsiquaye,K.N. , S.Amini , H.Kessler, R.G.Bird , G.Tovey , A.J.Zuckermann : Ultrastructural changes in the liver in experimental NANB hepatitis. Br.J.Exp.Pathol.62 : 41-51 , 1981

193. Uibo,R.M. , H.J.Helin , K.J.E.Krohn : Immunological reactions to liver specific membrane lipoprotein (LSP) in experimental autoimmune liver disease in rabbits. Clin.exp.Immunol.48 : 505-512 , 1982

194. Vierling,J.M. , D.L.Nelson , W.Strober , B.M.Bundy , E.A.Jones : In vitro cell-mediated cytotoxicity in primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis. Dysfunction of spontaneous cell-mediated cytotoxicity in PBC. : J.Clin.Invest.60 : 1116-1128 , 1977

195. Vitvitski,L. , C.Trepo , A.M.Prince , B.Brotman : Detection of virus associated antigen in serum and liver of patients with NANB hepatitis. Lancet II : 1263-1267 , 1979

196. Vogten,A.J.M. , N.Hadzic , R.G.Shorter , W.H.J. Summerskill , W.F.Taylor : Cell-mediated cytotoxicity in chronic active liver disease. A new test system. Gastroenterology 74 : 883-889 , 1978

197. Waldmann,T.A. , S.Broder , R.M.Blaese , M.Durm , M. Blackman , W.Strober : Role of SC in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia. Lancet II : 609-613 , 1974

198. Waldmann,T.A. , R.M.Blaese , S.Broder , R.S.Krakauer : Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity. Ann.Intern.Med.88 : 226-238 , 1978

199. Wands,J.R. , J.L.Perrotto , E.Alpert , K.J.Isselbacher : Cell-mediated immunity in acute and chronic hepatitis. J.Clin.Invest.55 : 921-929 , 1975

200. Ward,R. , S.Krugman , J.P.Giles , A.M.Jacobs , O.Bodansky : Infectious hepatitis : Studies of its natural history and prevention. N.Engl.J.Med.258 : 407-416 , 1958

201. Ware,A.J. , J.A.Cuthbert , J.Shorey , L.E.Gurian , E.H.Eigenbrodt , B.Combes : A prospective trial of steroid therapy in severe viral hepatitis. Gastroenterology 80 : 219-224 , 1981

202. Watanabe,S. , S.Saito , A.Yoshikawa , T.Shibayama , T.Kamimura , S.Suzuki , F.Ischida : Evaluation of the antiviral effects of Adenoside Arabinoside on chronic HBV-infection. Hepato-Gastroenterol.29 : 102-105 , 1982

203. Weigle,W.O. : Immunological unresponsiveness. Adv.Immunol.16 : 61-123 , 1973

204. Weller,I.V.D. , M.F.Bassendine , A.Craxi , M.J.F. Fowler , J.Monjardino , H.C.Thomas , S.Sherlock : Successful treatment of HB_s and HB_eAg positive chronic liver disease : prolonged inhibition of viral replication by highly soluble adenine arabinoside 5-monophosphate (ARA-AMP) Gut 23 : 717-723 , 1982

205. Wheelock,E.F. , S.T.Toy : Participation of lymphocytes in viral infections. Adv.Immunol.16 : 123-182 , 1973

206. Wolf,R.L. , J.Andreoni : Soluble inhibitory factor (SIF) in normal human serum. Cell.Immunol.67 : 299-311 , 1982

207. Woodruff,J.F. , J.J.Woodruff : The effect of viral infections on the function of the immune system. In : Viral immunology and immunopathology, Academic Press, New York : 393-418 , 1975

208. Woolf,J.L. , B.E.Boyes , D.M.Jones , J.S.Whittacker , E.Tapp , N.M.MacSween , P.H.Renton , F.Stratton , J.W. Dymock : Asymptomatic liver disease in hepatitis B antigen carriers. J.Clin.Pathol.27 : 348-352 , 1974

209. Wright,R. , R.W.McCollum , G.Klatskin : Australia antigen in acute and chronic liver disease. Lancet II : 117-121 , 1969

210. Yamamura,M. : Standardization of lymphocyte transformation to PHA Clin.exp.Immunol.14 : 457-467 , 1973

211. Yoshizawa,H. , Y.Akahane , Y.Itoh , S.Iwakiri , K.Kitajima , M.Morita , A.Tanaka , T.Nojiri , M.Shimizu , Y.Miyakawa , M.Mayumi : Viruslike particles in a plasma fraction (fibrinogen) and in the circulation of apparently healthy blood donors capable inducing NANB hepatitis in humans and in chimpanzees. Gastroenterology 79 : 512-520 , 1980

212. Zettermann,R.K. , J.A.Woltjen : SC activity in PBC. Dig.Dis.Sci.25 : 104-107 , 1980

Lebenslauf

Am 29.6.1954 wurde ich , Friedemann Hausch , als Sohn des Dr.med.Erwin Alfred Hausch und seiner Ehefrau Annemarie-Ruth in Gaildorf geboren . Nach der Grundschule besuchte ich 1965 bis zum Abitur 1973 das Gymnasium Gaildorf . Von November 1973 bis April 1974 war ich als Hilfspfleger an der Universitätskinderklinik in Ulm tätig .
Ab Sommersemester 1974 studierte ich zunächst an der Universität Freiburg , ab Wintersemester 1974/75 in Tübingen Chemie-Diplom.
Ab Wintersemester 1975/76 Studium der Medizin bis Sommer 1976 in Freiburg, danach bis einschließlich Sommersemester 1977 in München und ab Wintersemester 1977/78 an der Eberhard-Karls Universität Tübingen . In Tübingen legte ich nach dem Praktischen Jahr an der Universitäts-Frauenklinik, an der Medizinischen und der Chirurgischen Klinik Tübingen am 15.4.1983 den letzten Teil der Ärztlichen Prüfung ab .
Von August 1979 bis April 1981 führte ich die Untersuchungen zu vorliegenden Dissertation im Immunpathologischen Labor der Medizinischen Klinik Tübingen bei Herrn Prof.Dr.P.A.Berg durch .

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45